



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**CHARAKTERIZACE PHA PRODUKUJÍCÍCH BUNĚK
POMOCÍ POKROČILÝCH MIKROSKOPICKÝCH A
CYTOMETRICKÝCH TECHNIK**

CHARACTERIZATION OF PHA PRODUCING MICROBIAL CELLS BY ADVANCED MICROSCOPIC AND
CYTOMETRIC TECHNIQUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Karolína Dlouhá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1376/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Karolína Dlouhá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Charakterizace PHA produkujících buněk pomocí pokročilých mikroskopických a cytometrických technik

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Charakterizace vybraných PHA producentů pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie
3. Charakterizace vybraných producentů PHA pomocí průtokové cytometrie

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Karolína Dlouhá
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je zdokumentovat produkci polyhydroxyalkanoátů u vybraných bakteriálních kmenů, kterými byly *Pseudomonas thermotolerans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus thermostellatus*. U mikroorganismů *Tepidiphilus thermophilus* a *Pseudomonas thermotolerans* zatím nebyla produkce PHA popsána a u bakterií rodu *Chelatococcus*, které byly v této práci analyzovány, nebyla produkce zdokumentována pomocí elektronové mikroskopie.

V této práci byly vybraní producenti analyzováni nejdříve pomocí průtokové cytometrie s použitím fluorescenčních sond BODIPY a Nilská červeň. Vybraní producenti, u kterých se produkce potvrdila, byly analyzovány dalšími metodami, kterými byly fluorescenční mikroskopie, cryo-skenovací elektronové mikroskopie a na závěr transmisní elektronová mikroskopie. U bakteriální kultury *Pseudomonas thermotolerans* se produkce PHA nepotvrdila již při první analýze pomocí průtokového cytometru. U ostatních mikroorganismů byla produkce potvrzena. Bakterie rodu *Chelatococcus* se jasně prokázaly jako lepší producenti. Bakteriální buňky *Tepidiphilus thermophilus* produkovaly menší granule a v menším množství.

Klíčová slova: polyhydroxyalkanoáty, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, cryo-skenovací elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie, *Pseudomonas thermotolerans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Tepidiphilus thermophilus*, *Chelatococcus thermostellatus*

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is to document production of polyhydroxyalkanoates in selected bacterial strains, which were *Pseudomonas thermotolerans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Tepidiphilus thermophilus* and *Chelatococcus thermostellatus*. In the case of the microorganisms *Tepidiphilus thermophilus* and *Pseudomonas thermotolerans*, the production of PHA's has not yet been described, and in the *Chelatococcus* bacteria, which were analysed in this work, the production has not yet been documented by electron microscopy.

In this work, the selected producers were analysed by flow cytometry first, using BODIPY and Nile Red as fluorescence probes. Selected producers, for which was production confirmed, were analysed by other methods, such as fluorescence microscopy, cryo-scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. In the bacterial culture of *Pseudomonas thermotolerans*, PHA's production wasn't confirmed by the first analysis by flow cytometer. For other microorganisms was production confirmed. *Chelatococcus* bacteria clearly proved to be better producers. Bacterial cells of *Tepidiphilus thermophilus* produced smaller granules and in lower amount.

Key words: polyhydroxyalkanoates, flow cytometry, fluorescence microscopy, cryo-scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, *Pseudomonas thermotolerans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Tepidiphilus thermophilus*, *Chelatococcus thermostellatus*

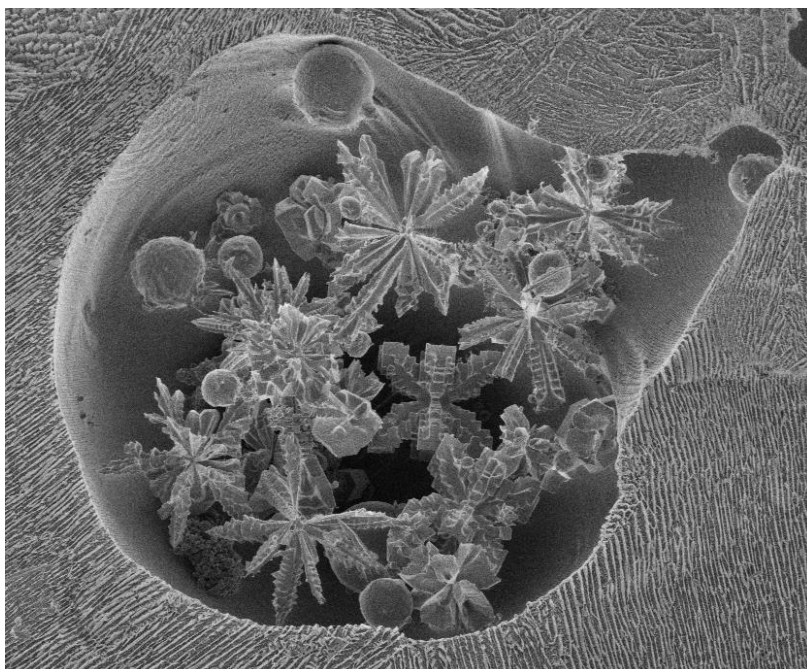
DLOUHÁ, K. *Charakterizace PHA produkujících buněk pomocí pokročilých mikroskopických a cytometrických technik*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Poděkování: Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. Za odborné vedení a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Danu Kučerovi za pomoc při práci v laboratoři, ochotu a vstřícný přístup. Jako dalšímu bych chtěla poděkovat Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za snímky z fluorescenčního mikroskopu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Vladislavu Krzyžánkovi, Ph.D. a Mgr. Kamile Hrubanové za poskytnutí snímků z elektronového mikroskopu a za možnost zúčastnit se samotné mikroskopické analýzy na Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně. Mé rodině, přátelům a příteli patří také velké díky.



Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Charakterizace polyhydroxyalkanoátů (PHA).....	8
2.1.1	Využití PHA	8
2.1.2	Biodegradabilita	8
2.2	Vznik PHA granulí.....	9
2.2.1	Lokalizace PHA granulí v buňce	10
2.2.1.1	Micelle Model	10
2.2.1.2	Budding Model	10
2.2.1.3	Scaffold Model	10
2.3	Bakterie schopné produkovat bioplasty.....	10
2.3.1	Tvar bakterií.....	10
2.4	Metody extrakce PHA	11
2.5	Techniky pro detekci PHA a její produkce u mikroorganismů.....	12
2.5.1	Průtoková cytometrie	12
2.5.2	Fluorescenční mikroskopie	14
2.5.2.1	Fluorescenční sondy.....	15
2.5.2.2	BODIPY (4,4-difluor-4-bor-3a, 4a-diaza-s-indacen).....	15
2.5.2.3	Fluorescenční analýza PHA.....	16
2.5.3	Elektronová mikroskopie.....	17
2.5.3.1	SEM (scanning electron microscope).....	17
2.5.3.2	Cryo-SEM	17
2.5.3.3	TEM (transmission electron microscope)	18
3	Experimentální část.....	19
3.1	Mikroorganismy, chemikálie, přístrojové vybavení	19
3.1.1	Použité mikroorganismy.....	19
3.1.2	Použité chemikálie.....	19
3.1.3	Fluorescenční sondy.....	19
3.1.4	Použité přístroje.....	19
3.2	Kultivace mikroorganismů.....	20
3.2.1	Kultivace <i>Chelatococcus thermostellatus</i>	20
3.2.2	Kultivace <i>Chelatococcus daeguensis</i>	21
3.2.3	Kultivace <i>Tepidiphilus thermophilus</i>	21
3.2.4	Kultivace <i>Pseudomonas thermotolerans</i>	21

3.3	Příprava vzorků.....	22
3.3.1	Průtoková cytometrie	22
3.3.2	Fluorescenční mikroskopie	22
3.3.3	Cryo-skenovací elektronová mikroskopie.....	23
3.3.4	Transmisní elektronová mikroskopie.....	23
4	Výsledky a diskuze.....	24
4.1	Průtoková cytometrie	24
4.2	Fluorescenční mikroskopie	26
4.3	Cryo-skenovací elektronová mikroskopie.....	27
4.4	Transmisní elektronová mikroskopie.....	30
5	Závěr.....	33
6	Seznam použitých zkratk.....	34
7	Seznam použité literatury	35

1 Úvod

Francouzský vědec, Maurice Lemoigne, objevil v roce 1926 první z polyhydroxyalkanoátů – polyhydroxybutyrát, který izoloval z bakterie *Bacillus megaterium*. Význam tohoto objevu byl po mnoho let přehlížen, z důvodu hojného výskytu ropy, která byla i levná. Ropná krize v 70. letech však přinesla zájem o nalezení alternativ k výrobkům z ropy [1].

V současné době se plasty používají v obrovském množství a jejich užitečnost je tak velká, že si bez nich nedokážeme představit moderní život. Protože plasty na bázi ropy nejsou biologicky rozložitelné, plastový odpad je velice trvanlivý a jeho likvidace je vážným problémem. Dalším problémem s těmito plasty je, že se vyčerpávají ropné zdroje, které jsou s tímto tempem spotřeby neobnovitelným zdrojem. Vzhledem k tomu, že plastový odpad z ropy znečišťuje životní prostředí, lze v bioplastech nalézt udržitelné řešení [1].

Plasty jsou polymery, které jsou sestaveny z podjednotek – monomerů. Ty jsou pomocí chemických vazeb pospojovány a tak tvoří makromolekulu. Pokud jsou podjednotky stejné, jedná se o homopolymer, pokud jsou různé, hovoříme o kopolymerech. PHA jsou polyestery různých hydroxyalkanoátů, které jsou syntetizovány mnoha gram – pozitivními a gram – negativními bakteriemi. Bakteriálně produkovaný polyhydroxybutyrát a další PHA mají dostatečně vysokou molekulovou hmotnost, aby mohly být považovány za polymery. Jejich mechanické vlastnosti jsou navíc velmi podobné polypropylenu, který se často používá na výrobu různých obalových materiálů, lahví, apod. [2][3].

Bioplasty v současné době tvoří pouze malou část světové produkce plastů. Proces extrakce polyhydroxyalkanoátů z bakterií je finančně náročný a výtěžky jsou přitom nízké. Z toho důvodu je v současné době stále snaha o nalezení vhodného producenta, aby byla produkce tohoto polymeru co nejvyšší. PHA nachází zatím uplatnění jako speciální biodegradabilní a biokompatibilní materiál, který se využívá například v medicíně [1].

Cílem této bakalářské práce je zdokumentovat produkci PHA u vybraných bakteriálních producentů, zejména pomocí transmisní elektronové mikroskopie a fluorescenčních technik, kde bylo sledováno množství PHA granulí v buňce.

2 Teoretická část

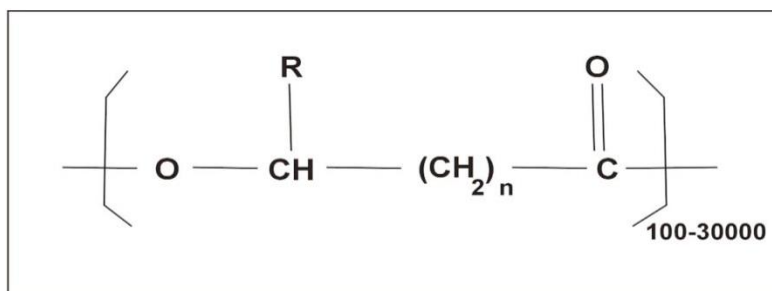
2.1 Charakterizace polyhydroxyalkanoátů (PHA)

Polyhydroxyalkanoáty jsou biokompatibilní a biodegradabilní polymery, které jsou některé bakterie schopné syntetizovat jako svou zásobní látku.

PHA jsou nerozpustné ve vodě a proto tvoří inkluzní tělíska (granule), které mohou přispívat k velké frakci buněčné sušiny (v extrémních podmínkách až 90% suché hmoty buňky) [5].

Jsou syntetizovány mikroorganismy s nevyváženým růstem. PHA slouží jako zásobní energie a také pomáhá mikroorganismům přežít za nepříznivých podmínek. Granule PHA mají na svém povrchu značné množství proteinů, což naznačuje, že nejsou jen pouhá zásobárna uhlíku a energie, ale že se jedná spíše o supramolekulární komplexy se specifickými funkcemi. Tyto biopolymery získaly v poslední době velkou pozornost pro potenciální aplikace v různých sférách [4][5].

Jako první bylo PHA objeveno v bakterii *Bacillus megaterium* ve formě poly(3-hydroxybutyrátu). Bylo popsáno okolo 150 různých typů PHA. Základní struktura je popsána na Obrázku 1. Polyhydroxyalkanoáty lze rozdělit do tří tříd v závislosti na délce uhlíkového řetězce (scl-, mcl- a lcl-). Scl-PHA má méně než 5 atomů uhlíku, mcl-PHA 5-14 atomů uhlíku a lcl-PHA více než 14 uhlíků [6].



Obrázek 1: Základní struktura PHA [6]

2.1.1 Využití PHA

Díky svojí kompletní biodegradabilitě a fyzikálně-chemickým vlastnostem, které jsou podobné syntetickým plastům se předpokládá, že by mohly být vhodným kandidátem k jejich nahrazení [7].

PHA lze použít k pokrytí papíru nebo lepenky a vytvořit tak voděodolný povrch. V současné době je používána kombinace lepenky s hliníkem, který však není biodegradabilní [7].

Byla také navržena metoda převedení polystyrenového odpadu na biodegradabilní PHA. Nejprve je polystyren převeden na styrenový olej pomocí pyrolýzy. Ten je následně přeměněn pomocí *Pseudomonas putida* CA-3 na mcl-PHA [7].

Biodegradabilní polymery mají široké využití také v medicíně. Polyhydroxyalkanoáty jsou často používány ve tkáňovém inženýrství. Jsou velmi využívány jako kostní implantáty, osteosyntetické materiály a chirurgické stehy. PHA jsou také užitečné při pomalém uvolňování léčiv a hormonů [7].

2.1.2 Biodegradabilita

Polyhydroxyalkanoáty jsou považovány za materiály šetrné k životnímu prostředí, protože jsou syntetizovány z obnovitelných zdrojů a mohou být degradovány PHA-degradujícími mikroorganismy, které hydrolyzují PHA prostřednictvím tvorby

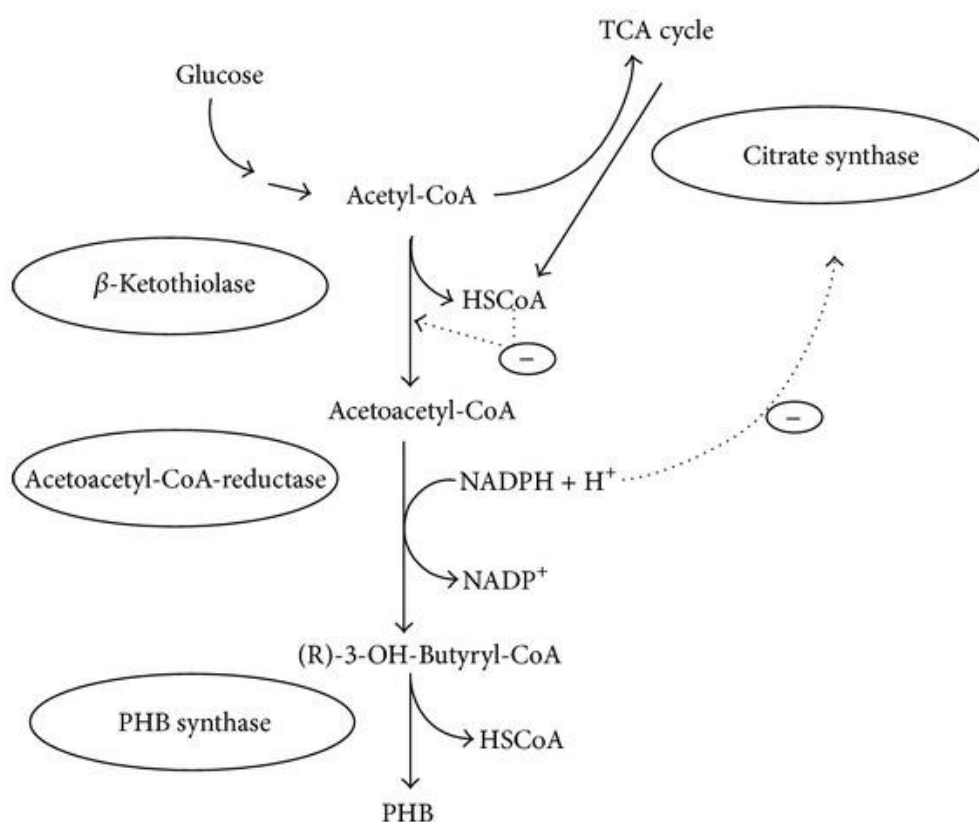
specifických PHB/PHA depolymeráz. Mikroorganismy degradující PHA byly izolovány z mnoha různých prostředí, včetně bezkyslíkatých ekosystémů a jsou proto považovány za všudypřítomné [5].

Snad jednou z největších výhod, které PHA mají vůči jiným biologicky odbouratelným polymerům, je jejich schopnost rozkládat se za aerobních i anaerobních podmínek. Můžou být také degradovány tepelně nebo enzymatickou hydrolýzou. V biologickém systému mohou být degradovány pomocí mikrobiálních depolymeráz stejně jako neenzymatickou a enzymatickou hydrolýzou v živočišných tkáních [8].

Biodegradabilita polymeru se řídí především jeho fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že nízkomolekulární PHA jsou citlivější na biodegradaci. Teplota tání je dalším důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při studiu biodegradability. Se zvyšujícím se bodem tání se biodegradabilita snižuje a s rostoucí teplotou tání se snižuje enzymatická rozložitelnost [9].

2.2 Vznik PHA granulí

Biochemická dráha vedoucí z centrálních meziproduktů k PHB je poměrně jednoduchá a vyžaduje pouze tři enzymatické kroky, počínaje kondenzací dvou molekul acetyl-koenzymu A (thiolázová reakce) na acetoacetyl-CoA a jeho následnou redukcí (reduktázová reakce) na monomerní prekurzor PHB, 3-hydroxybutyryl-CoA (3HBCoA) v reakci katalyzované acetoacetyl-CoA reduktázou. Vysoká koncentrace NADPH a NADH inhibuje citrátsyntázu citrátového cyklu, což zajišťuje dostupnost acetyl-CoA pro β -ketothiolázu. Následuje polymerizace 3-hydroxybutyryl-CoA molekul na PHB pomocí PHB syntázy [5][10].



Obrázek 2: Schéma syntézy PHB [10]

2.2.1 Lokalizace PHA granulí v buňce

V důsledku snahy o maximální syntézu PHB optimalizací podmínek, jsou snímky TEM pořizovány právě, když jsou bakteriální kmeny na konci fáze akumulace PHB. Obsah PHB v takovýchto buňkách představuje často 70% buněčné sušiny, v některých případech i více. Granule tak zabírají skoro celý objem cytoplazmy. Závěry o lokalizaci granulí z takových snímků potom nemohou být relevantní. Aby bylo možné řešit tuto otázku, je nutné například pozorovat buňky s teprve nově vznikajícími granulemi PHB [5].

V současnosti je diskutováno několik modelů tvorby PHB, která je spojena i s jejich lokalizací v buňce [5].

2.2.1.1 *Micelle Model*

Tento model předpokládá, že pokud je koncentrace substrátu (3-hydroxybutyryl-CoA) dostatečně vysoká, rozpustné cytoplazmatické molekuly PHB syntázy začínají produkovat hydrofobní molekulu PHB. Vzhledem k tomu, že je PHB hydrofobní, vznikající polymerní řetězce agregují a tvoří struktury podobné micelám. Na povrchu nesou částečně hydrofilní molekuly PhaC [5].

Důsledkem Micelle Model je, že k iniciaci tvorby PHB granulí dochází na jakémkoliv místě v cytoplazmě. PHB granule by tedy měly být více či méně náhodně rozmístěny v objemu buňky [5].

2.2.1.2 *Budding Model*

Podle tohoto modelu je PHB syntáza přímo umístěna v cytoplazmatické membráně, nebo je k ní přímo nebo nepřímo připojena. Rostoucí hydrofobní řetězec PHB je pak uvolněn do dvojvrstvy membrány, což vede k tvorbě granulí uvnitř cytoplazmatické membrány. Jakmile dosáhnou PHB granule určitého rozměru, oddělí se od cytoplazmatické membrány [5].

Pokud je Budding Model správný, mělo by být alespoň časně stadium PHB granulí lokalizováno v cytoplazmatické membráně, nebo alespoň v její těsné blízkosti [5].

2.2.1.3 *Scaffold Model*

Takzvaný Scaffold Model předpokládá, že PHB syntáza vznikajících PHB granulí je nebo se teprve připojí k dosud neznámé molekule scaffoldu uvnitř buňky [5].

V tomto případě by lokalizace PHB granulí v buňce závisela na povaze a lokalizaci scaffoldu buňky akumulující PHB [5].

2.3 Bakterie schopné produkovat bioplasty

V souvislosti s produkcí PHA mohou být bakterie rozděleny do dvou skupin. V první skupině jsou bakterie, které nevytváří PHA ve fázi růstu. Tyto bakterie vyžadují omezení některých živin jako například kyslíku, dusíku nebo fosforu. Druhou skupinu tvoří naopak bakterie, které vytváří PHA v růstové fázi a nepotřebují žádné omezení živin [6].

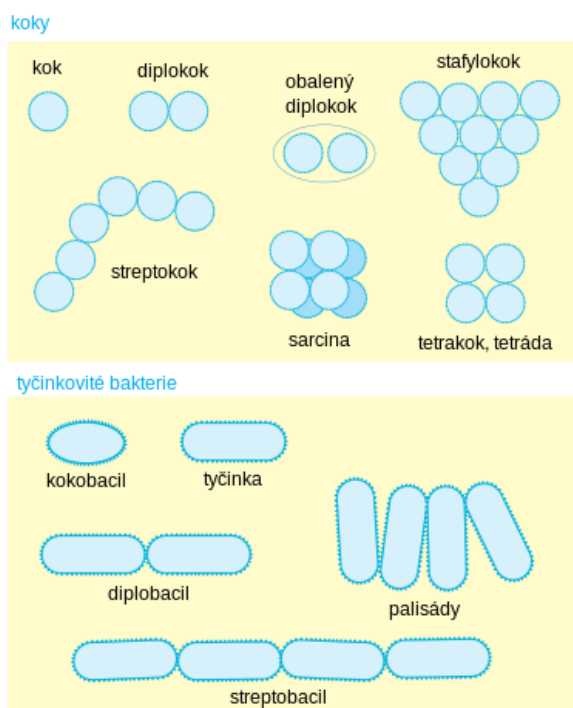
Bylo zjištěno, že většina bakterií produkujících PHA jsou gram-negativní. Scl-PHA je obvykle syntetizován ve velkém množství bakteriálními druhy z rodů *Azohydromonas*, *Burkholderia* a *Cupriavidus*. Produkce PHA u gram-pozitivních bakterií byla zaznamenána u rodu *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microbunus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* a *Streptomyces* [11].

2.3.1 Tvar bakterií

Tvary bakteriálních buněk mohou být velice rozmanité. Morfologie je v podstatě způsob jakým se bakterie vyrovnávají s prostředím ve kterém žijí, co se týká například přístupu k živinám nebo úniku predátorům. Tvar může být v některých případech tak důležitý, že

organismus může změnit svou morfologii tak, aby odpovídala okolnostem [12].

Dva nejběžněji se vyskytující bakteriální tvary jsou tyčinky a koky. Tyčinky mohou být buď rovné nebo zakřivené. Mohou být samostatné nebo uspořádané dohromady. Diplobacili jsou dvě tyčinky vedle sebe, streptobacili jsou řetězce tyčinek. Koky jsou bakterie, které mají kulovitý nebo oválný tvar. Pokud se dělí v jedné rovině tak vznikají řetězky (streptokoky). Dělením v různých rovinách pak vznikají nepravidelné shluky (stafylokoky). Další možné tvary bakteriálních buněk jsou například spirochety, nebo tvar písmene Y, který lze pozorovat u bifidobakterií [13][14].



Obrázek 3: Některé tvary bakteriálních buněk [15]

2.4 Metody extrakce PHA

Mikrobiální PHA jsou ukládány jako nerozpustné intracelulární granule. Metody získání PHA typicky zahrnují lýzu buněčné stěny/buněčné membrány, solubilizaci a čištění PHA složky a srážení PHA polymeru. Obvyklými metodami pro získání tohoto polymeru z mikrobiální biomasy jsou metody extrakce rozpouštědlem a chemicky a enzymaticky založené digestivní metody [11].

Ze všech metod extrakce PHA, je metoda extrakce rozpouštědlem nejvíce zavedená a běžně používaná kvůli vysoké čistotě získaného polymeru. Extrakce rozpouštědlem nedegraduje polymer a může být užitečná pro některé lékařské aplikace eliminací endotoxinu, který lze nalézt v gramnegativních bakteriích. Ukázalo se, že extrakce PHB z *Escherichia coli* použitím chloroformu snížila hladinu endotoxinu na přípustnou hranici. Rozpouštědla využívaná k extrakci PHA jsou však nebezpečná pro obsluhu i životní prostředí. Extrakce rozpouštědlem je široce používána v laboratořích ale ve velkoplošném zpracování jen omezeně [11][16].

Chemicky digestivní metody získání PHA jsou osvědčenou alternativou k extrakci rozpouštědlem. Při chemickém štěpení se používají povrchově aktivní látky nebo chlornan sodný. Povrchově aktivní látky, jako je například dodecylsírán sodný (SDS), narušují buňky inkorporací do membrány. Povrchově aktivní látky vstupují do membrány, dokud není buněčný obal nasycený. S dalším přidavkem pak dojde ke štěpení membrány za vzniku micel a membránových fosfolipidů, což vede k uvolnění PHB do roztoku. Další metodou

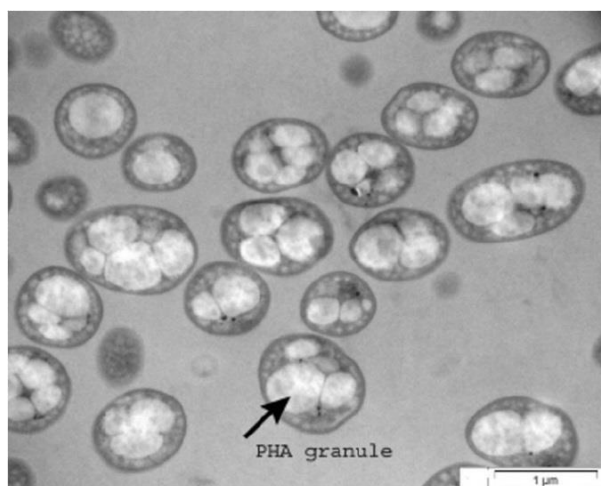
extrakce je využití chlornanu sodného pro štěpení buněčných složek. Tato metoda je jednoduchá a účinná ale polymery získané štěpením chlornanem sodným vykazují obecně nižší molekulové hmotnosti v důsledku silné degradace polymeru [11][16].

Enzymatické štěpení vyžaduje ve srovnání s extrakcí rozpouštědlem a chemickým štěpením mírnější podmínky a zároveň dosahuje zanedbatelné degradace produktu, ale jeho nevýhodou je vysoká cena [11].

2.5 Techniky pro detekci PHA a její produkce u mikroorganismů

Pro detekci a analýzu intracelulární mikrobiální PHA jsou k dispozici různé metody. Tyto metody jsou užitečné při identifikaci nových mikroorganismů produkujících PHA nebo při rutinním sledování bio-procesů produkce PHA. Metody, které detekují PHA nebo PHA produkující kapacitu v mikroorganismech zahrnují barvení kolonie/buňky, detekci genu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) [11].

Barvení buněk a detekce genů se často používají jako přední metody pro screening a identifikaci nových mikroorganismů s potenciálem produkce PHA, díky relativně snadné přípravě vzorku a krátké době analýzy. Transmisní elektronová mikroskopie umožňuje přímou vizualizaci PHA, které se zobrazují jako intracelulární granule, což potvrzuje bio-akumulaci PHA. Příprava vzorku pro TEM je však časově a finančně náročná. [11].



Obrázek 4: Transmisní elektronový mikroskop - *Pseudomonas putida* obsahující PHA granule [17]

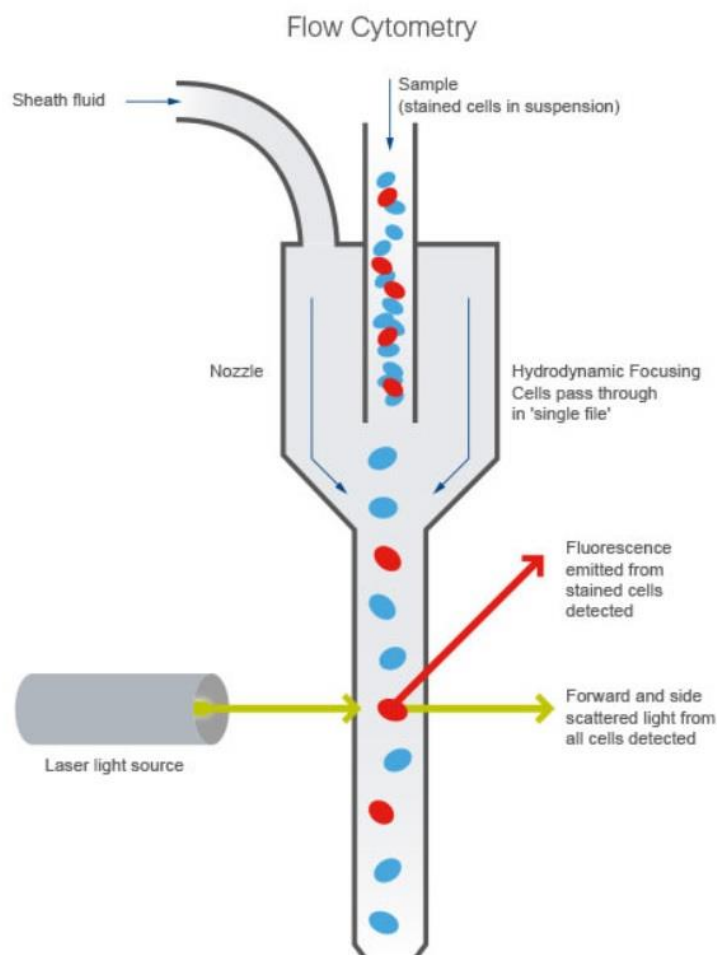
2.5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je široce používaná metoda pro rychlou analýzu buněk. Umožňuje charakterizaci a definování různých buněčných typů v heterogenní buněčné populaci. Analyzuje také velikost a objem jednotlivých buněk. Používá se převážně k měření intenzity fluorescence produkované fluorescenčními protilátkami, detekující proteiny nebo ligandy, které se vážou na specifické molekuly spojené s buňkami [18].

Všechny formy cytometrie závisí na základních fyzikálních zákonech, včetně těch týkajících se kapalin, optiky a elektroniky. Průtoková cytometrie je systém pro zaznamenávání pohybu buněk nebo částic v proudu kapaliny přes laser. Je měřen rozptyl světla a barevné rozlišení fluorescence mikroskopických částic [19].

Suspenze buněk prochází cytometrem nejprve přes zkuševku, která je umístěna v nádobě s plášťovou tekutinou. Kapalina pláště se používá k hydrodynamickému zaostření buněčné suspenze. Malý proud tekutiny s sebou strhává buňky kolem laserového světla tak, aby vždy prošla měřícím úsekem právě jedna částice. Tento proces se nazývá hydrodynamická fokusace [18].

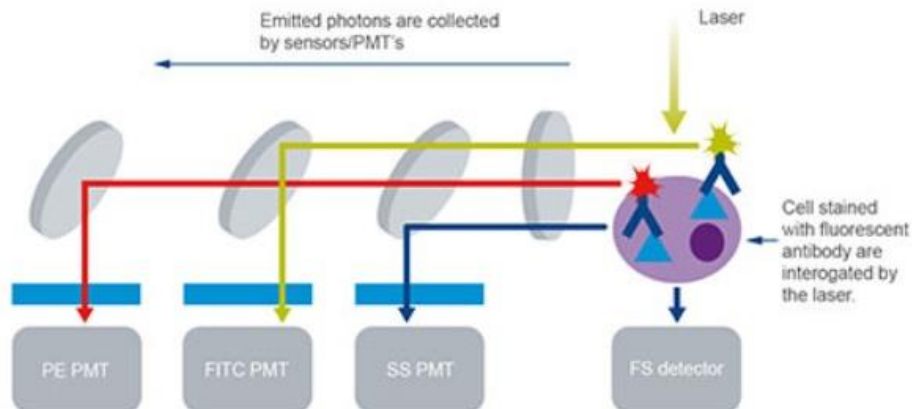
Když buňky procházejí laserovým paprskem, je detekován rozptyl světla. Detektor, který je před laserovým paprskem měří dopředný rozptyl (FS) a několik detektorů na stranách měří postranní rozptyl (SS). Fluorescenční detektory měří fluorescenci vyzařovanou z pozitivně zbarvených buněk nebo částic [18].



Obrázek 5: Průtoková cytometrie – princip [20]

Dopředný rozptyl koreluje s velikostí buněk a postranní rozptyl je úměrný granularitě a vnitřní členitosti buněk. Tímto způsobem můžou být buněčné populace rozlišovány na základě rozdílných velikostí a granularity [18].

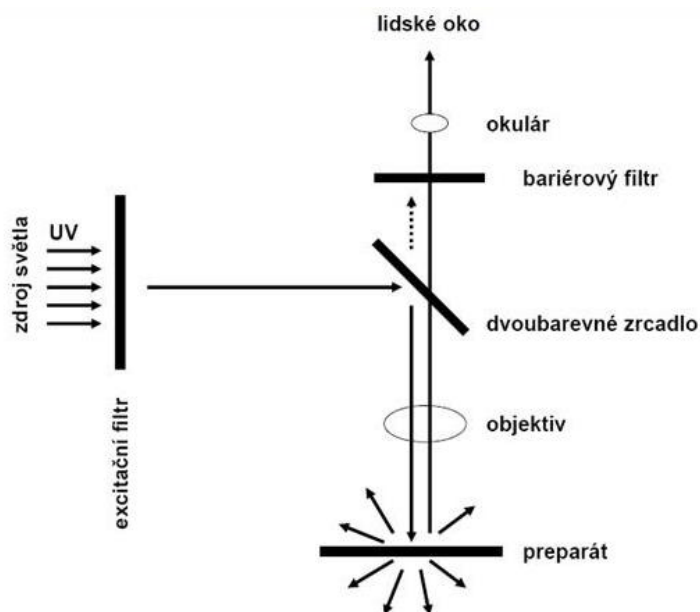
Buňky mohou být také rozděleny podle toho, zda nesou určitý protein. V tomto případě se fluorochrom používá k odbarvení požadovaného proteinu. Fluorochromy, které se používají k detekci cílových proteinů vyzařují světlo, pokud byl použit laser s odpovídající vlnovou délkou. Tyto fluorescenčně zbarvené buňky mohou být detekovány jednotlivě. Přední a boční rozptýlené světlo a fluorescence z obarvených buněk jsou rozděleny do definovaných vlnových délek a vedeny sadou filtrů a zrcadel uvnitř průtokového cytometru. Fluorescenční světlo je filtrováno tak, aby každý snímač detekoval fluorescenci pouze při určené vlnové délce. Tyto snímače se nazývají fotonásobící trubky (PMT) [18].



Obrázek 6: PMT detektory [21]

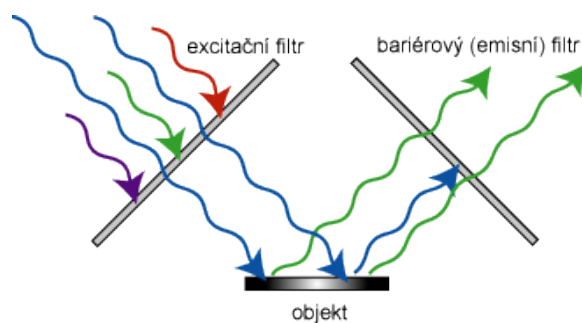
2.5.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je jednou ze zobrazovacích metod světelné mikroskopie, která využívá fluorescence sledovaných objektů. Fluorescence může být buď primární (autofluorescence), nebo sekundární (nepřímá). Pokud sledovaný objekt fluoreskuje sám o sobě, jedná se o primární fluorescenci. V opačném případě je nutné fluorescenci vyvolat navázáním fluorochromu. Chemickou strukturou jsou fluorochromy obvykle organické látky s aromatickými kruhy a delokalizovanými elektrony schopnými excitace [22].



Obrázek 7: Princip fluorescenčního mikroskopu [23]

Fluorescenční mikroskopie je v současnosti velmi využívána a jedním z hlavních důvodů je její vysoká citlivost. Ta je způsobena vysokým kontrastem fluoreskující látky a tmavého pozadí. Aby bylo dosaženo takového kontrastu, využívá se dvou filtrů, které nám na základě vlnových délek oddělí excitační a emisní spektrum. Excitační filtr vymezuje rozsah vlnových délek pro excitaci, emisní filtr zase vymezuje spektra představující požadovaný signál [22].



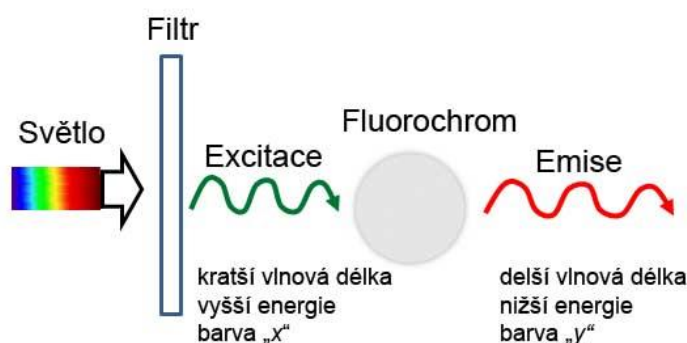
Obrázek 8: Excitační a emisní filtr [22]

2.5.2.1 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou látky, které jsou po ozáření světlem o určité vlnové délce schopné emitovat záření. Jsou to tedy látky schopné fluorescence [24].

Aby bylo možné pozorovat pouze světlo o požadované vlnové délce, je třeba odstranit ostatní záření o jiných vlnových délkách. Eliminace nežádoucího záření se děje pomocí filtrů, které propouští pouze světlo určité vlnové délky [24].

Většina biomolekul nemá vlastní fluorescenci. Aby je bylo možné pozorovat, musí se k nim navázat nějaká fluorescenční sonda. Musí se však dbát na to, aby nebyla porušena biologická funkce sledovaného objektu.



Obrázek 9: Schéma excitace a emise fluorochromu [25]

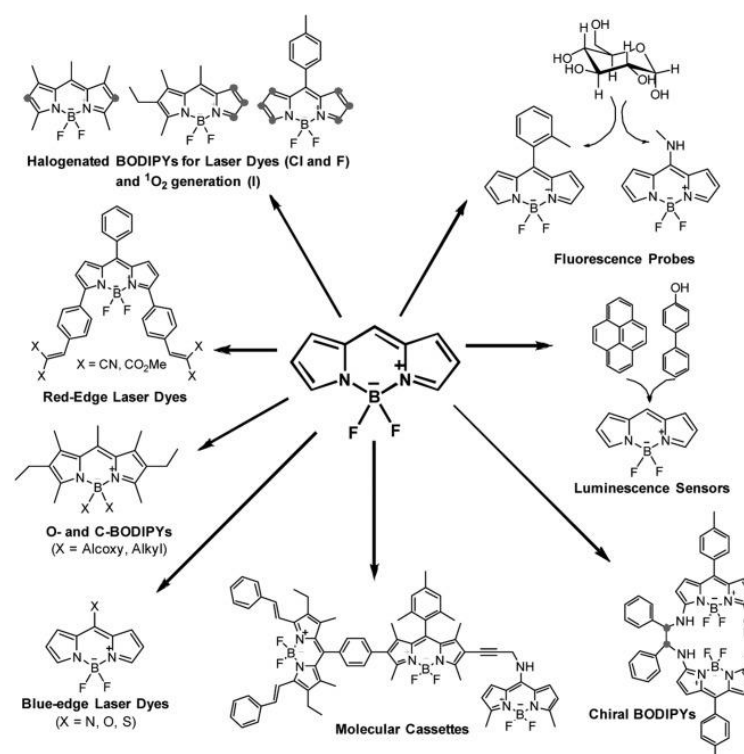
2.5.2.2 BODIPY (4,4-difluor-4-bor-3a, 4a-diaza-s-indacen)

V současnosti roste počet vědeckých a technologických aplikací barviv BODIPY díky možnosti modulace jejich spektroskopických vlastností a nebo vyvolání nových fotofyzikálních procesů. BODIPY barviva jsou velice fotostabilní a mají velkou tepelnou odolnost. Tyto vlastnosti velmi závisí na jejich molekulární struktuře. Tento chromofor je snadno rozpustný ve většině organických rozpouštědlech a je charakterizován silnými absorpčními a fluorescenčními spektrálními pásy v zelenožluté části viditelného spektra [26].

Hlavním důvodem úspěchu a všestrannosti BODIPY je jeho chromoforické jádro, které je snadno dostupné pro velké množství organických syntetických cest [26].

Intenzivní fluorescenční barvivo BODIPY je lipofilní, na rozdíl od většiny barviv které jsou charakterizovány v dané části absorpčního spektra [27].

BODIPY 493/503 je vhodné díky svojí nepolární struktuře a díky absorpci při vyšších vlnových délkách k barvení neutrálních lipidů, olejů a polymerů [27].

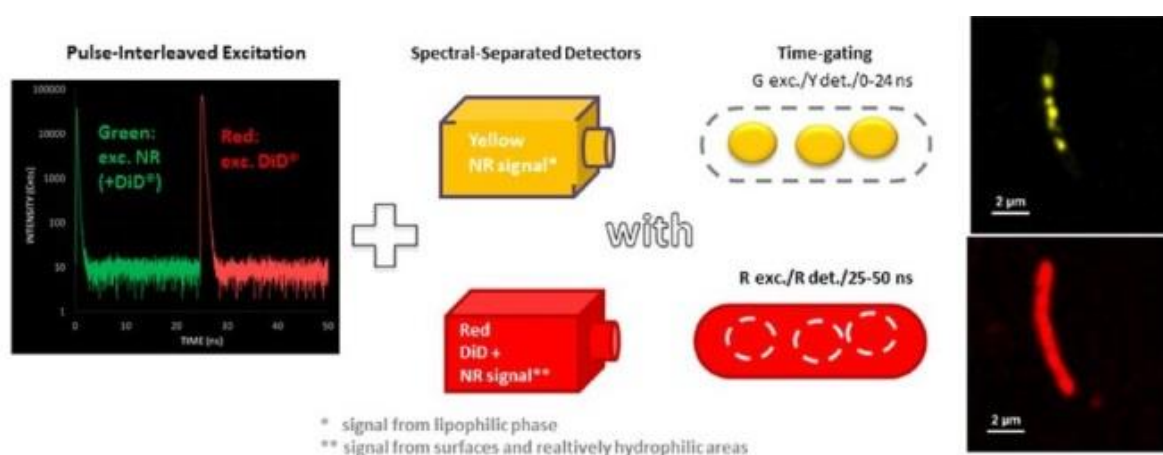


Obrázek 10: Schéma možných modifikací BODIPY [28]

2.5.2.3 Fluorescenční analýza PHA

Fluorescenční mikroskopii lze využít pro stanovení relativního obsahu a geometrických parametrů granulí a buněk a pro studium jejich morfologie během růstu. Buňky se zbarví vybranými fluorescenčními sondami, například amfifilní DiD a hydrofobní Nilskou červení, kde DiD slouží jako membránová sonda, protože její dominantní frakce se nachází ve vnější části bakteriálních buněk. Dominantní frakce Nilské červení se nachází v granulích [29].

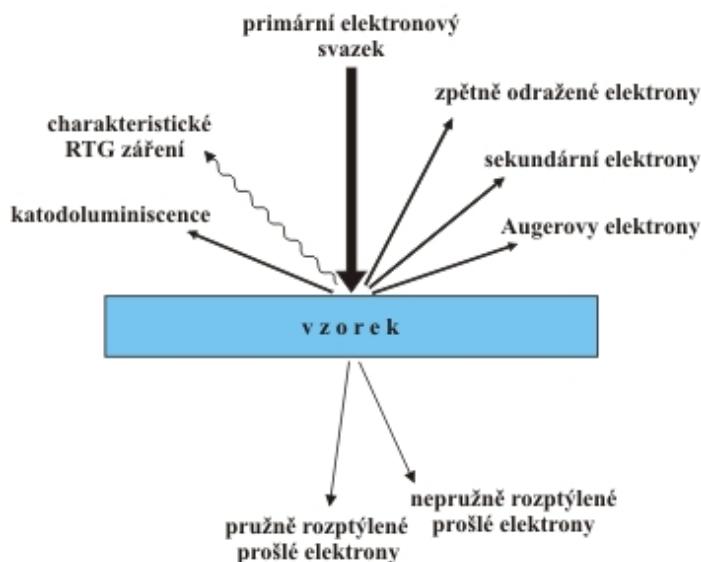
Tato metoda umožňuje provádět analýzu na úrovni jednotlivých buněk. Každý parametr lze tedy určit jednotlivě pro každou buňku, takže je možné popsat stupeň buněčné heterogenity [29].



Obrázek 11: Princip separace fluorescenčních signálů [29]

2.5.3 Elektronová mikroskopie

Elektronové mikroskopy využívají místo světla proud elektronů. Pozorovaný vzorek i svazek elektronů musí být však umístěn ve vakuu, aby nedocházelo k narušení dráhy letících elektronů atmosférou. Elektronovou mikroskopií dosáhneme mnohem vyššího rozlišení oproti světelné mikroskopii. Mezní rozlišovací schopnost mikroskopů je úměrná vlnové délce použitého záření. Elektronové záření má výrazně kratší vlnovou délku ($\sim 0,01\text{--}0,001\text{ nm}$) než viditelné světlo ($400\text{--}700\text{ nm}$) [30].



Obrázek 12: Schéma dopadu elektronů a jejich interakce se vzorkem [31]

2.5.3.1 SEM (scanning electron microscope)

Skenovací elektronové mikroskopy se využívají pro analýzu povrchů libovolně velkých vzorků (velikost je omezena velikostí vakuové komory). Pomocí SEM můžeme získat obrazy povrchů širokého spektra materiálů [30].

Rastrovací elektronový mikroskop funguje tak, že na vzorek dopadá tenký svazek elektronů, který dopadá postupně na všechna místa vzorku. Odražený (emitovaný) paprsek se převádí na viditelný obraz [32].

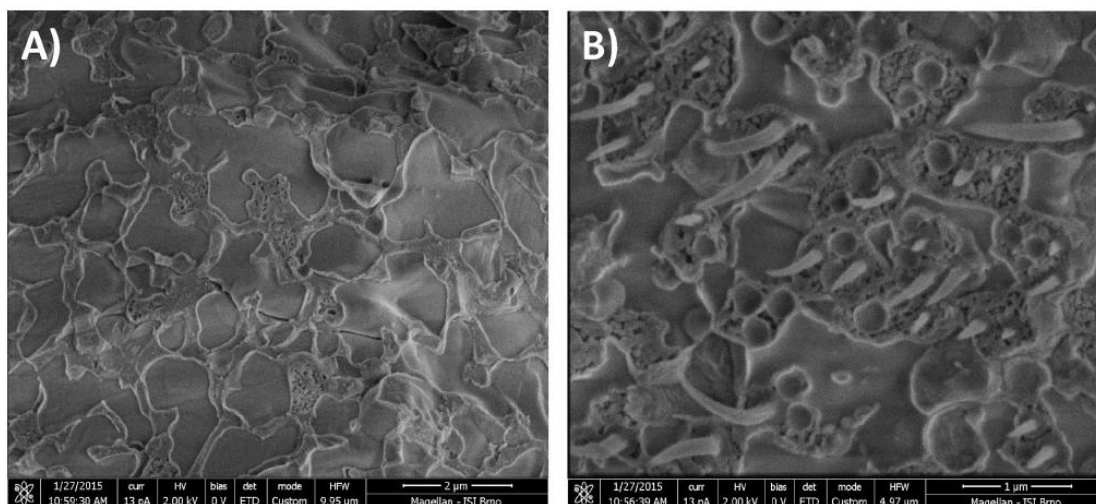
2.5.3.2 Cryo-SEM

Jedná se o formu elektronové mikroskopie, kdy je hydratovaný vzorek kryogenicky zmrazen. Tato fixace se většinou provádí pomocí tekutého dusíku [33].

Voda tvoří asi 90% rostlinných a živočišných tkání, což je v oblasti skenovací elektronové mikroskopie problém, protože vzorek musí být suchý. Cryo-SEM je tedy efektivní způsob jak obejít tento nezanedbatelný problém. Dále je tato technika široce využívána pro pozorování „obtížných“ vzorků, jako třeba těch, které jsou méně stabilní při ozáření svazkem elektronů. Další důležitou, a často přehlíženou aplikací cryo-SEM, je možnost použití této techniky ke studiu dynamických procesů, a to pomocí časově odlišených vzorků [33].

Příchod různých režimů vysokého tlaku umožnil pozorovat hydratované vzorky bez použití mrazení, cryo-SEM je však stále neúčinnější způsob, jak zabránit ztrátě vody ze vzorku [33].

Dalšími výhodami cryo-SEM je možnost pozorovat zlomený vzorek, a tedy vidět i vnitřní strukturu daného objektu, nebo také pomocí řízené sublimace vzorku odstraňovat povrchovou vodu, čímž se odhalí více detailů [33].



Obrázek 13: Cryo-SEM mikrograf A) *C. necator* neprodukující PHB; B) *C. necator* produkující PHB [34]

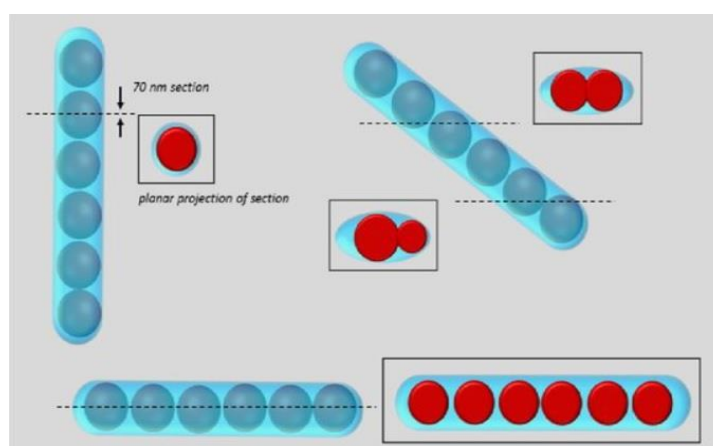
Na Obrázku 13 jsou snímky bakteriálních buněk produkujících a neprodukujících PHB. Pro buňky obsahující tento polymer jsou charakteristické útvary podobné jehlám, zatímco u buněk bez PHB tyto útvary chybí. Vznik těchto deformací během mrazení nebyl zatím vysvětlen. Zmrazené granule PHB vykazují zcela odlišné mechanické a fyzikálně chemické vlastnosti, než jakákoliv jiná část bakteriální cytoplazmy [34].

2.5.3.3 TEM (transmission electron microscope)

Pomocí transmisních (prozařovacích) elektronových mikroskopů můžeme provádět analýzu vnitřní struktury vzorku a také zobrazit jednotlivé atomy. Nutností však je, aby byl vzorek dostatečně tenký (10-500 nm), aby jím svazek elektronů mohl projít. Oproti SEM je zde tedy složitější příprava vzorku. Další nevýhodou TEM je, že pozorovaný objekt musí být umístěn ve vakuu, což znemožňuje pozorování živých organismů [30][32].

Viditelný obraz se vytváří na fluorescenčním stínítku svazkem elektronů, které prošly studovaným vzorkem, nebo které ve vzorku difraktovaly [32].

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie se většinou pozoruje morfologie buněk obsahujících PHA, počet granulí v bakteriálních buňkách, jejich velikost a lokalizace v buňce. Stanovení průměru granulí PHA je pomocí mikroskopických technik obtížné. Rozlišení světelné mikroskopie je nedostačující a v případě transmisní elektronové mikroskopie záleží na relativní poloze buňky, kterou byl veden řez. Pouze v případě, že je řez ve střední části granule PHA, může být přesně určen její průměr. Bez statistické analýzy nejsou snímky z TEM ideální pro odhad velikostí a tvarů bakteriálních buněk a granulí PHA [29].



Obrázek 14: Vliv přípravy tenkých řezů pro TEM na pozorované morfologie a průměry buněk a granulí PHA [29]

3 Experimentální část

3.1 Mikroorganismy, chemikálie, přístrojové vybavení

3.1.1 Použité mikroorganismy

V této práci byly využity bakteriální kultury *Pseudomonas thermotolerans* DSM 14292, *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069, *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220 a *Chelatococcus thermostellatus* DSM 28244. Všechny tyto kultury byly získány z institutu Leibnitz, Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur Braunschweig.

3.1.2 Použité chemikálie

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- NH_4Cl
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- $(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$
- NaCl
- KCl
- FeCl_3
- CaCl_2
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{NiCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- Nutrient Broth (HiMedia)
- Peptone bacteriological (HiMedia)
- Beef Extract Powder (HiMedia)
- Glukóza
- Glycerol
- Fruktóza

3.1.3 Fluorescenční sondy

- BODIPY 493/503
- Nilská červeň

3.1.4 Použité přístroje

- Průtokový cytometr, Apogee A50, Apogee Flow Systems
- Fluorescenční mikroskop, MicroTime 200, PicoQuant GmbH

- Skenovací elektronový mikroskop Magellan 400
- Laminární box Aura mini, Bio air instrument
- Analytické váhy, Boeco
- Předvážky EW 620, Kern
- Centrifuga, Hettich MIKRO 200
- Centrifuga, Boeco U-32R
- Temperovaná třepačka Heidolph unimax 1010
- Transmisní elektronový mikroskop JEOL JEM-1010

3.2 Kultivace mikroorganismů

3.2.1 Kultivace *Chelatococcus thermostellatus*

Inokulum *Chelatococcus thermostellatus* bylo připraveno do 100 ml Erlenmeyerových baněk, objem inokula byl 50 ml. Médium bylo vysterilizováno, zaočkováno a ponecháno na temperované třepačce po dobu 24 h při teplotě 50 °C.

Po uplynutí této doby bylo připraveno produkční médium do 250 ml Erlenmeyerové baňky v objemu 100 ml, do kterého byla po sterilizaci přidána glukóza a směs stopových prvků. Poté bylo produkční médium zaočkováno. Bylo přidáno 10% z celkového objemu inokula, tedy 5 ml. Následovala kultivace po dobu 72 h v temperované třepačce při 50 °C.

Inokulum:

Nutrient broth	25 g / l
----------------	----------

Produkční médium:

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	9 g / l
KH ₂ PO ₄	1,5 g / l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g / l
NH ₄ Cl	1 g / l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02 g / l
NH ₄ Fe(III) citrát	0,0012 g / l

Po sterilaci bylo přidáno:

Glukóza (40 g / l)	5 ml / 100 ml
Směs stopových prvků	1 ml / l

Obsah směsi stopových prvků:

EDTA	50 g / l
FeCl ₃	8,3 g / l
ZnCl ₂	0,84 g / l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,13 g / l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g / l
MnCl ₂ · 6 H ₂ O	0,016 g / l
H ₃ BO ₃	0,1 g / l
Destilovaná voda	1000 ml

3.2.2 Kultivace *Chelatococcus daeguensis*

Inokulum *Chelatococcus daeguensis* bylo připraveno v objemu 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Médium bylo vysterylizováno, zaočkováno a ponecháno na temperované třepačce po dobu 24h při teplotě 30 °C.

Po uplynutí této doby bylo připraveno produkční médium do 250 ml Erlenmeyerové baňky v objemu 100 ml, do kterého byla po sterilizaci přidána glukóza a směs stopových prvků, stejná jako pro *Chelatococcus thermostellatus*. Poté bylo produkční médium zaočkováno. Bylo přidáno 10% z celkového objemu inokula, tedy 5 ml. Následovala kultivace po dobu 72 h v temperované třepačce při 30 °C.

Inokulum i produkční médium bylo stejné jako pro *Chelatococcus thermostellatus*.

3.2.3 Kultivace *Tepidiphilus thermophilus*

Inokulum *Tepidiphilus thermophilus* bylo připraveno do 100 ml Erlenmeyerových baněk, kdežto objem inokula byl 50 ml. Médium bylo vysterylizováno. Po sterilizaci byla přidána glukóza. Poté bylo médium zaočkováno a ponecháno na temperované třepačce po dobu 24h při teplotě 55 °C.

Po uplynutí této doby bylo připraveno produkční médium do 250 ml Erlenmeyerové baňky v objemu 100 ml, do kterého byl po sterilizaci přidán glycerol a směs stopových prvků, stejná jako pro *Chelatococcus thermostellatus*. Poté bylo produkční médium zaočkováno. Bylo přidáno 10% z celkového objemu inokula, tedy 5 ml. Následovala kultivace po dobu 72 h v temperované třepačce při 55 °C.

Produkční médium bylo stejné jako pro *Chelatococcus thermostellatus*, jen po sterilizaci bylo přidáno místo glukózy 1,58 ml glycerolu.

Inokulum:

Peptone bacteriological	15 g / l
Beef Extract Powder	3 g / l
NaCl	6 g / l

Po sterilaci:

Glukóza (40 g / l)	75 µl / 50 ml
--------------------	---------------

3.2.4 Kultivace *Pseudomonas thermotolerans*

Inokulum *Pseudomonas thermotolerans* bylo připraveno v objemu 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Médium bylo vysterylizováno, zaočkováno a ponecháno na temperované třepačce po dobu 24h při teplotě 45 °C.

Po uplynutí této doby bylo připraveno produkční médium do 250 ml Erlenmeyerové baňky v objemu 100 ml, do kterého byla po sterilizaci přidána fruktóza a směs stopových prvků. Poté bylo produkční médium zaočkováno. Bylo přidáno 10% z celkového objemu inokula, tedy 5 ml. Následovala kultivace po dobu 72 h v temperované třepačce při 45 °C.

Inokulum:

Nutrient broth	25 g / l
----------------	----------

Produkční médium:

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g / l
KH ₂ PO ₄	1,02 g / l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g / l
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g / l

Po sterilaci bylo přidáno:

Fruktóza (40 g / l)	5 ml / 100 ml
Směs stopových prvků	1 ml / l

Obsah směsi stopových prvků:

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,218 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156 g
NiCl ₃ · 6 H ₂ O	0,118 g
CrCl ₃ · 6 H ₂ O	0,105 g
0,1 M HCl	1000 ml

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Průtoková cytometrie

Vzorky bakteriálních kultur pro průtokovou cytometrii byly připraveny následujícím způsobem. Bylo připraveno 100 ml produkční suspenze bakterií (viz. kapitola 3.2), z níž bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkupek Eppendorf. Suspenze byla následně centrifugována při 10 000 rpm po dobu 1 minuty. Supernatant byl slit a biomasa byla poté resuspendována v 1,5 ml fosfátového pufru. Suspenze byla dále 50krát zředěna (do další mikrozkupek Eppendorf přišlo 20 µl bakteriální suspenze a 980 µl fosfátového pufru). Pouze u bakteriální kultury *Pseudomonas thermotolerans* bylo nutné další ředění (100krát).

Fosfátový pufr:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilovaná voda	1000 ml

Před samotným měřením bylo do 1 ml takto připravené bakteriální suspenze přidáno barvivo, a to buď BODIPY, nebo Nilská červeň. BODIPY bylo přidáváno v objemu 3 µl a inkubováno 5 minut ve tmě. Nilská červeň byla přidávána v objemu 5 µl a inkubována 5 minut ve tmě.

3.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Z připravené produkční suspenze bakterií (viz. kapitola 3.2) bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkupek Eppendorf. Suspenze byla následně centrifugována při 10 000 rpm po dobu 1 minuty. Supernatant byl slit a biomasa byla poté resuspendována v 1,5 ml fosfátového pufru. Suspenze byla dále 50krát zředěna (do další mikrozkupek Eppendorf bylo přidáno 20 µl bakteriální suspenze a 980 µl fosfátového pufru).

Do 1 ml takto připraveného vzorku bylo následně přidáno barvivo BODIPY v objemu 3 µl. Inkubace ve tmě probíhala po dobu 10 minut.

3.3.3 Cryo-skenovací elektronová mikroskopie

Příprava vzorků a pak i samotná analýza proběhla na Ústavu přístrojové techniky AV ČR, Brno.

Z připravené produkční suspenze bakterií (viz. kapitola 3.2) bylo odebráno 10 ml do centrifugačních zkumavek. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 10 000 rpm. Supernatant byl slit a biomasa byla resuspendována v 10 ml fosfátového pufru. Následovala další centrifugace po dobu 5 minut při 10 000 rpm.

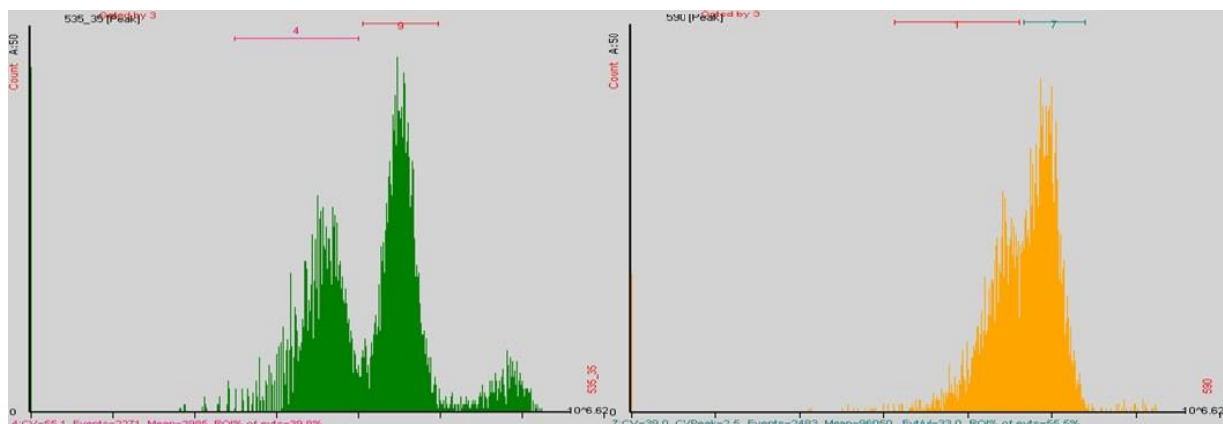
Kultura byla zmražena pomocí kapalného dusíku. Potom byly vzorky vloženy do kryo vakuové komory, kde došlo pomocí skalpelu k rozbití vzorku. Následovala krátká sublimace. Takto připravený vzorek byl potom přemístěn pomocí člunku za vysokého vakua do skenovacího elektronového mikroskopu. Vzorky byly pozorovány bez pokovení povrchu.

3.3.4 Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky byly připraveny na Ústavu přístrojové techniky AV ČR, Brno. Samotná analýza pak probíhala na pracovišti biologického centra AV ČR, České Budějovice.

4 Výsledky a diskuze

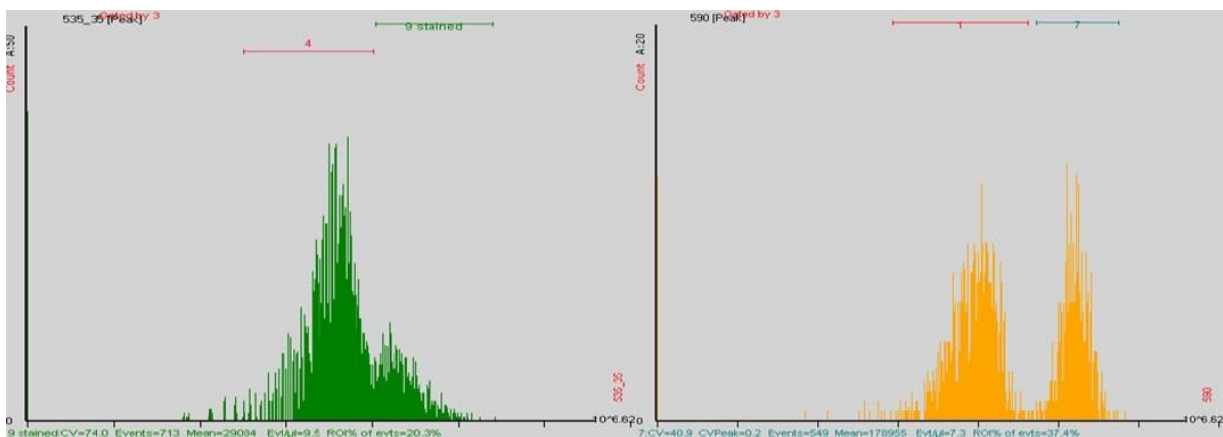
4.1 Průtoková cytometrie



Obrázek 15: Histogramy vzorku *Tepidiphilus thermophilus* s použitím barviv BODIPY (vlevo) a Nilská červeň (vpravo)

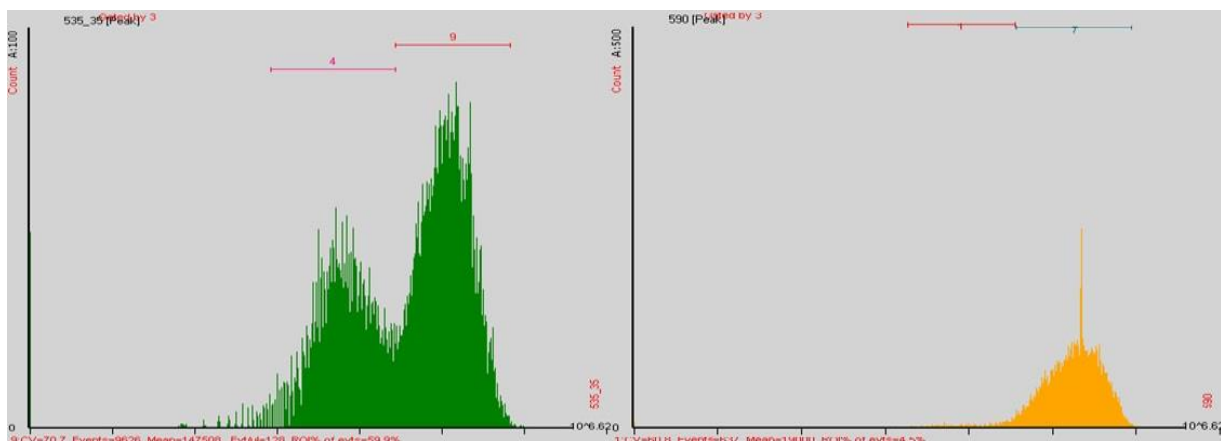
Na Obrázku 15 jsou dva histogramy, kde na ose x je vždy intenzita fluorescence a na ose y počet buněk o dané intenzitě. U histogramu vlevo bylo použito barvivo BODIPY, u histogramu vpravo zase Nilská červeň.

Analyzovaný mikroorganismus byl zde *Tepidiphilus thermophilus*. U prvního (zeleného) histogramu jsou dva větší píky. První pík znázorňuje objekty ve vzorku, které nefluoreskují, tedy buňky které neprodukují PHB, nebo je jeho obsah v těchto buňkách malý. Druhý pík, který je posunutý k větším intenzitám fluorescence znázorňuje buňky bohaté na PHB. Konkrétně zde bylo detekováno 48,9 % PHB produkujících buněk. U druhého histogramu (vpravo), kde bylo použito barvivo Nilská červeň, jsou také dva píky, které jsou ale více u sebe. Zde bylo 55,5 % produkujících buněk.



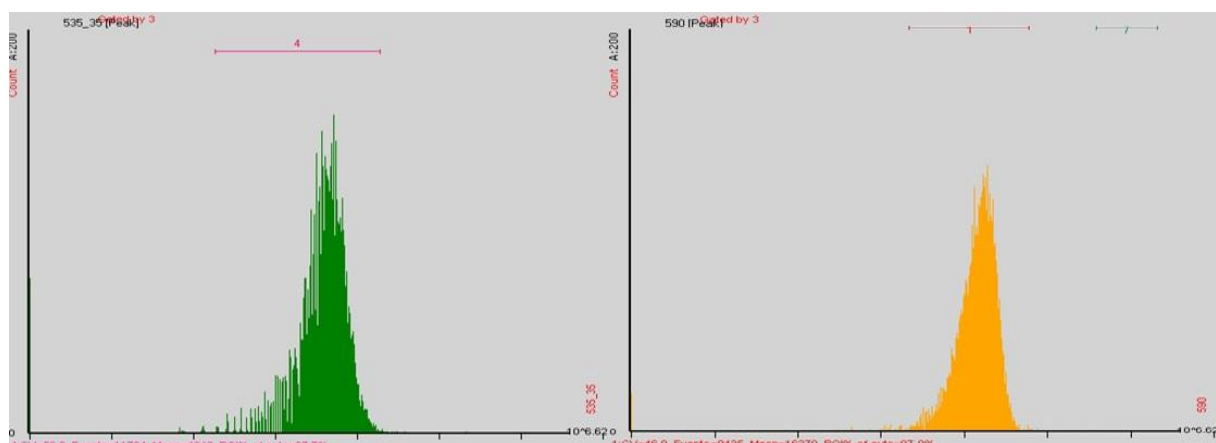
Obrázek 16: Histogramy vzorku *Chelatococcus daeguensis* s použitím barviv BODIPY (vlevo) a Nilská červeň (vpravo)

Na Obrázku 16 jsou opět histogramy kde byly použity barviva BODIPY a Nilská červeň. Analyzovaný mikroorganismus byl zde *Chelatococcus daeguensis*. U obou barviv jsou pozorovatelné dvě subpopulace, které se liší obsahem polymeru. Při měření s barvivem BODIPY vyšlo 20,3 % buněk s vysokým obsahem polymeru a s Nilskou červení 37,4 % buněk s vysokým obsahem polymeru.



Obrázek 17: Histogramy vzorku *Chelatococcus thermostellatus* s použitím barviv BODIPY (vlevo) a Nílská červeň (vpravo)

Na Obrázku 17 jsou histogramy kde byl analyzovaný mikroorganismus *Chelatococcus thermostellatus*. Použitá barviva byly opět BODIPY a Nílská červeň. U histogramu kde bylo použito BODIPY jsou dva píky. Bylo zde zaznamenáno 59,9 % produkujících buněk. Na druhém histogramu je pouze jeden pík. Sice se jednalo o stejný vzorek jako při použití barviva BODIPY, ale měření probíhalo později, kdy byl tento vzorek opakovaně zmražen. Tím mohlo dojít k poškození vzorku.



Obrázek 18: Histogramy vzorku *Pseudomonas thermotolerans* s použitím barviv BODIPY (vlevo) a Nílská červeň (vpravo)

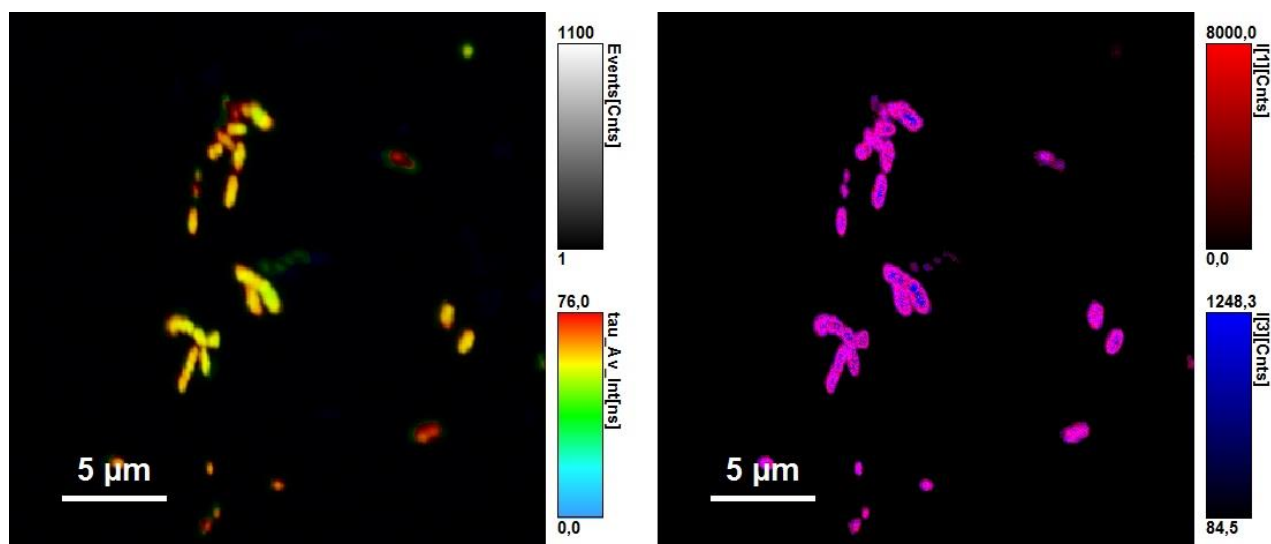
Na Obrázku 18 jsou opět histogramy kde byly použity barviva BODIPY a Nílská červeň. Analyzovaný mikroorganismus byl zde *Pseudomonas thermotolerans*. S použitím obou barviv byl zaznamenán pouze jeden pík, což naznačuje že daná bakterie neprodukuje PHB.

Protože se produkce neprokázala ani s jedním barvivem, byl mikroorganismus *Pseudomonas thermotolerans* vyřazen z dalších metod analýzy, které byly využity v této práci.

U mikroorganismů, kde byla produkce PHB prokázána s použitím obou barviv, bylo vždy vyšší procento produkujících buněk s použitím Nílské červeně. Je to pravděpodobně pro to, že Nílská červeň barví i další hydrofobní buněčné části. Barvivo BODIPY je v tomto případě nejspíš více specifické pro barvení PHB granulí.

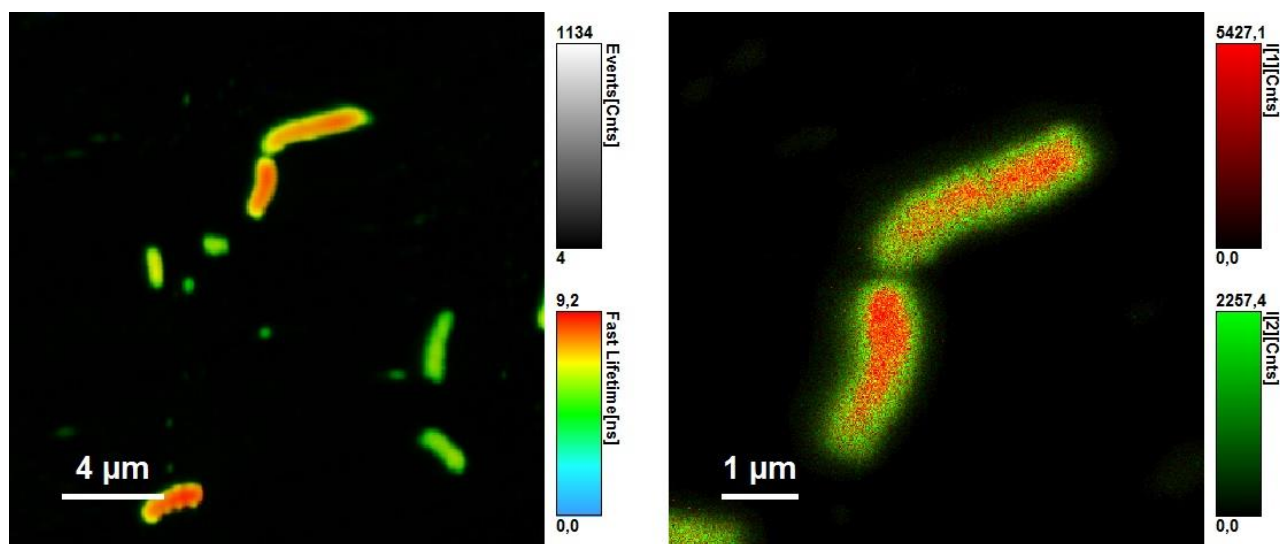
4.2 Fluorescenční mikroskopie

Na snímcích vlevo byl vzorek analyzován na dobu života fluoroforu, kde barevná škála odpovídá průměrné době života. Na snímcích vpravo byly pak k charakteristickým dobám života přiřazeny jednotlivé barvy, kde jejich zastoupení odpovídá intenzitě barvy.



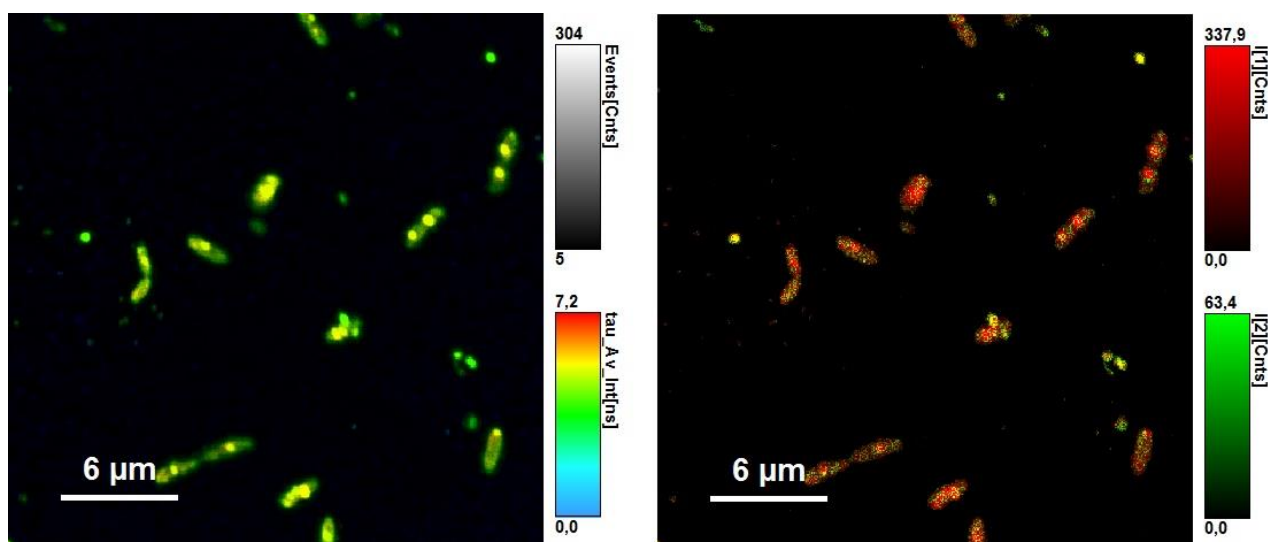
Obrázek 19: Snímky z fluorescenčního mikroskopu – *Chelatococcus daeguensis*

Bakteriální kultura *Chelatococcus daeguensis* tvořila spíše shluky buněk. Buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou velké asi 2-3 µm. V těchto buňkách bylo nejspíše více granulí, které jsou blízko u sebe. Na snímcích tak nejsou vidět jednotlivé granule, ale spíše shluky.



Obrázek 20: Snímky z fluorescenčního mikroskopu – *Chelatococcus thermostellatus*

Bakteriální kultura *Chelatococcus thermostellatus* shluky netvořila, buňky byly spíše oddělené. Měly opět tyčinkovitý tvar. Jejich velikost je v rozmezí 3-4 µm. Buňky také obsahovaly více granulí PHB, proto na snímcích nejsou vidět jednotlivě.

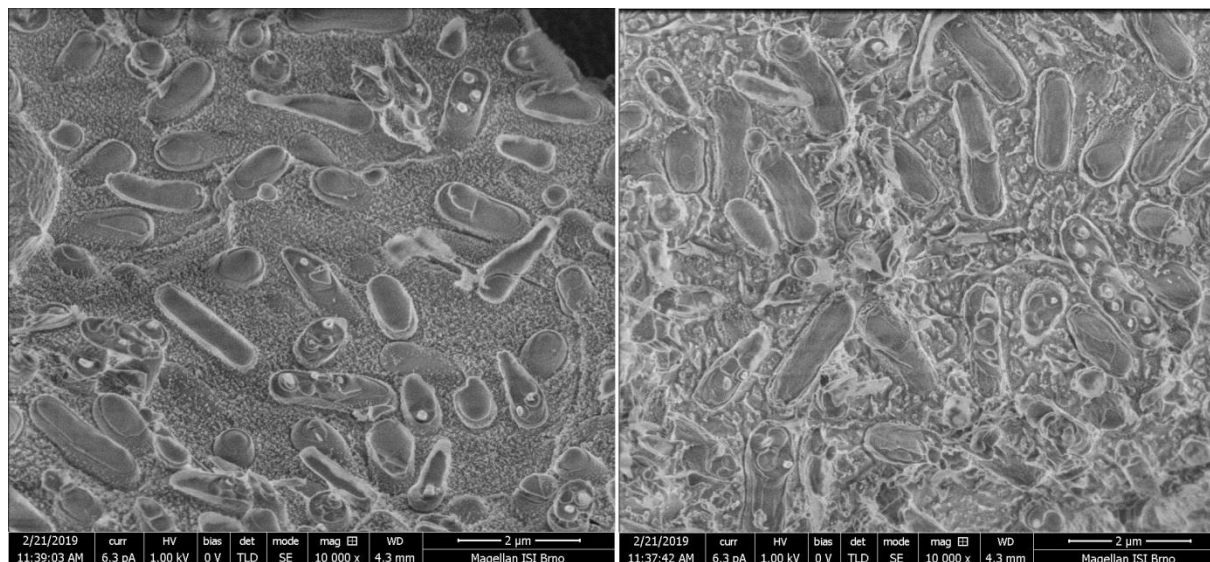


Obrázek 21: Snímky z fluorescenčního mikroskopu – *Tepidiphilus thermophilus*

Bakteriální kultura *Tepidiphilus thermophilus* také netvořila shluky, buňky byly oddělené. Měly opět tyčinkovitý tvar a jejich velikost byla 3-4 μm. Oproti předchozím mikroorganismům však tyto buňky neobsahovaly tolik granulí PHB. Na Obrázku 21 lze tedy pozorovat jednotlivé granule.

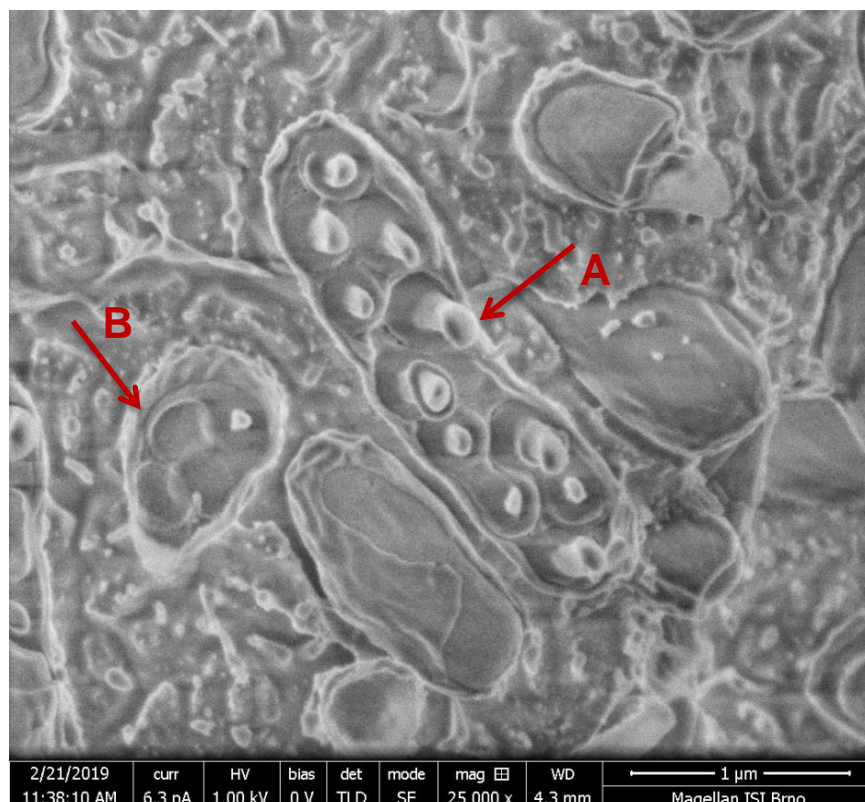
Všechny analyzované mikroorganismy v této práci mají dle snímků z fluorescenčního mikroskopu velmi podobný tvar i velikost. U mikroorganismů *Chelatococcus daeguensis* a *Chelatococcus thermostellatus* se prokázala vyšší produkce PHB než u *Tepidiphilus thermophilus*.

4.3 Cryo-skenovací elektronová mikroskopie



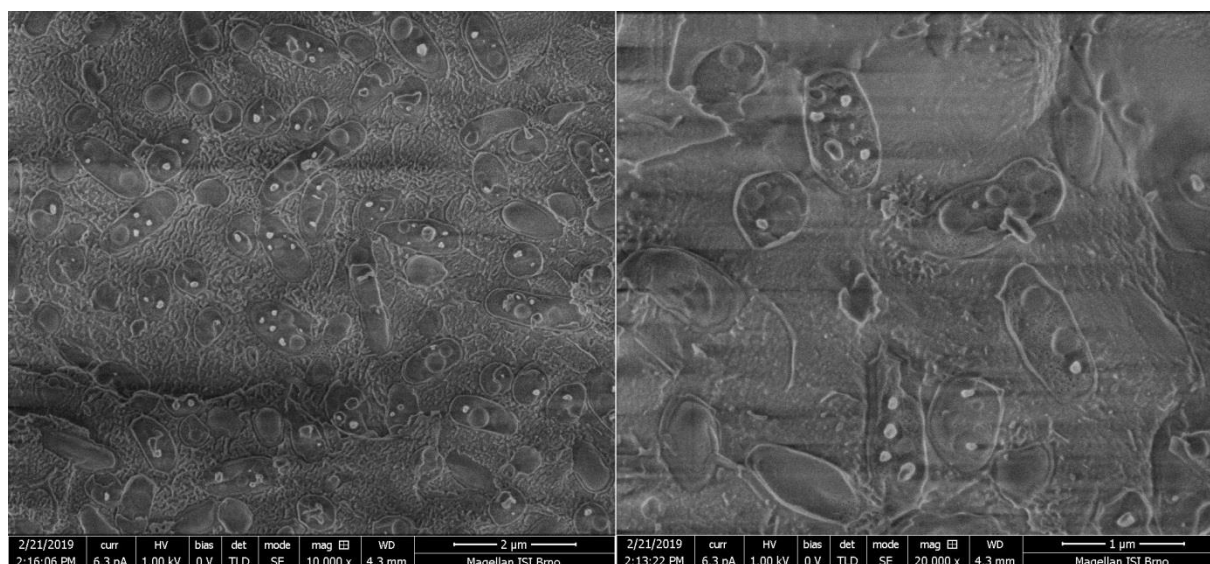
Obrázek 22: Snímky z cryo-SEM – *Chelatococcus thermostellatus*

Na Obrázku 22 jsou snímky bakteriálních buněk *Chelatococcus thermostellatus*. Některé buňky se podařilo rozlomit, takže bylo možné pozorovat kromě jejich povrchu i vnitřní strukturu. U takto rozlomených buněk jsou viditelné granule PHB, nebo místa, kde granule vypadly. Snímky potvrdily produkci PHB u tohoto mikroorganismu.



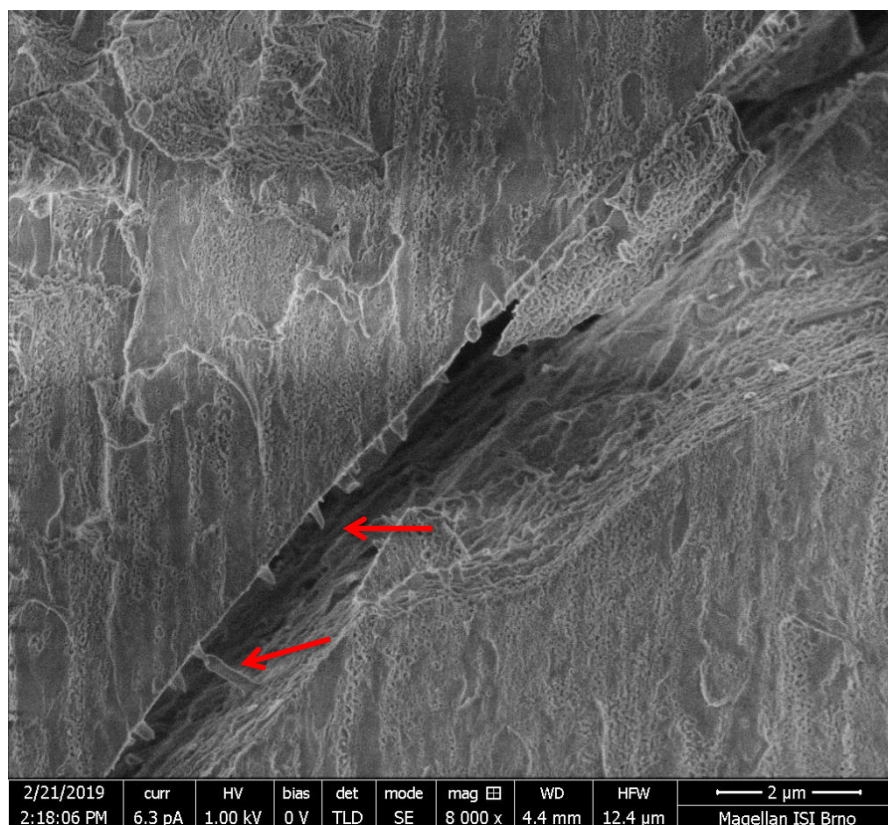
Obrázek 23: Snímek z cryo-SEM – *Chelatococcus thermostellatus* (A – plastické deformace granulí PHB; B – prázdná místa po vypadnutí granulí)

Na Obrázku 23 můžeme u PHB granulí pozorovat očekávané plastické deformace (A), které vznikají během lámání vzorku. Vznik plastických deformací je velice zajímavý fenomén, který dokazuje unikátní mechanické vlastnosti amorfních intracelulárních granulí, které si zachovávají vysokou flexibilitu i při velice nízkých teplotách. Jsou zde také viditelná místa, odkud granule vypadly při zlomení buňky (B).



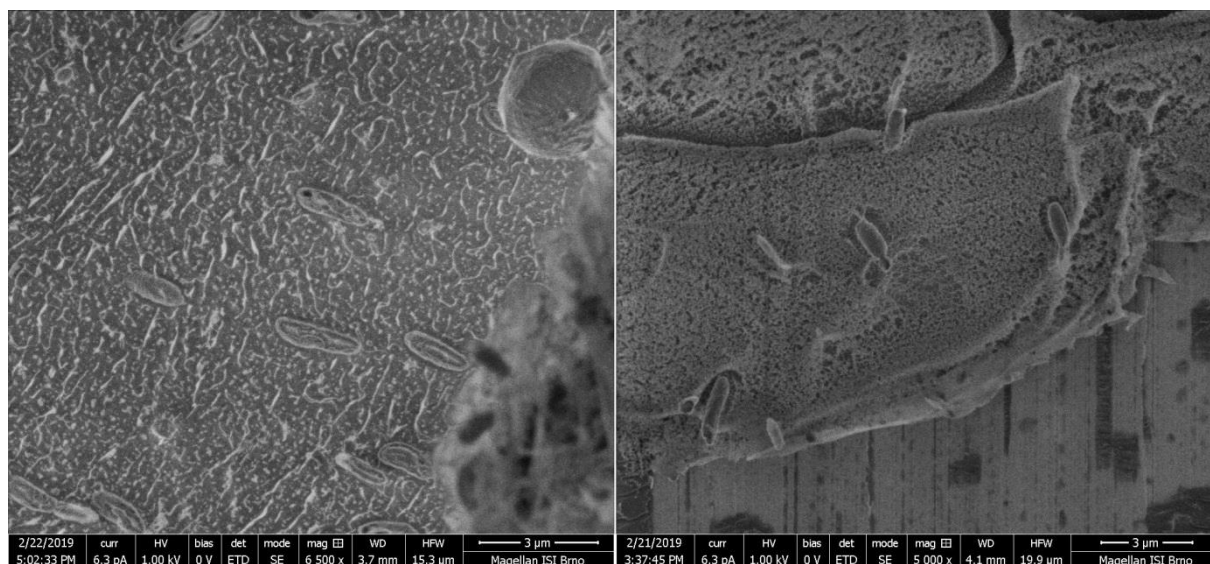
Obrázek 24: Snímky z cryo-SEM – *Chelatococcus daeguensis*

Na Obrázku 24 jsou snímky bakteriálních buněk *Chelatococcus daeguensis*. Zde byla většina buněk rozlomených. Bylo tedy možné pozorovat jejich vnitřní strukturu. Produkce PHB se u tohoto mikroorganismu také potvrdila. Byly zde opět pozorovány plastické deformace granulí a prázdná místa po jejich vypadnutí při lámání vzorku.



Obrázek 25: Snímek z cryo-SEM – *Chelatococcus daeguensis*

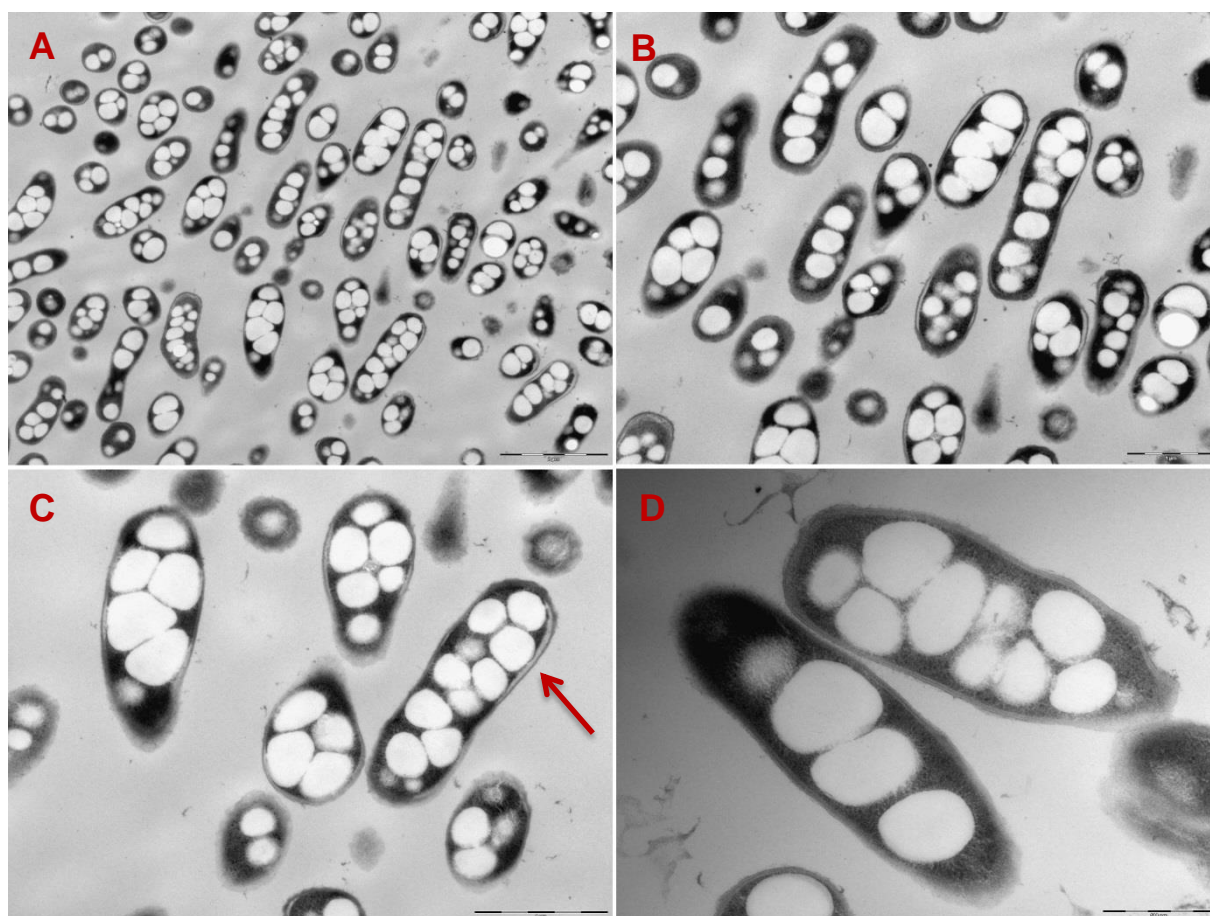
Na Obrázku 25 je snímek lomu vzorku, ve kterém můžeme pozorovat vyčnívající jehlicovité útvary, které jsou velmi flexibilní. Jedná se opět o plastické deformace PHB granulí.



Obrázek 26: Snímky z cryo-SEM – *Tepidiphilus thermophilus*

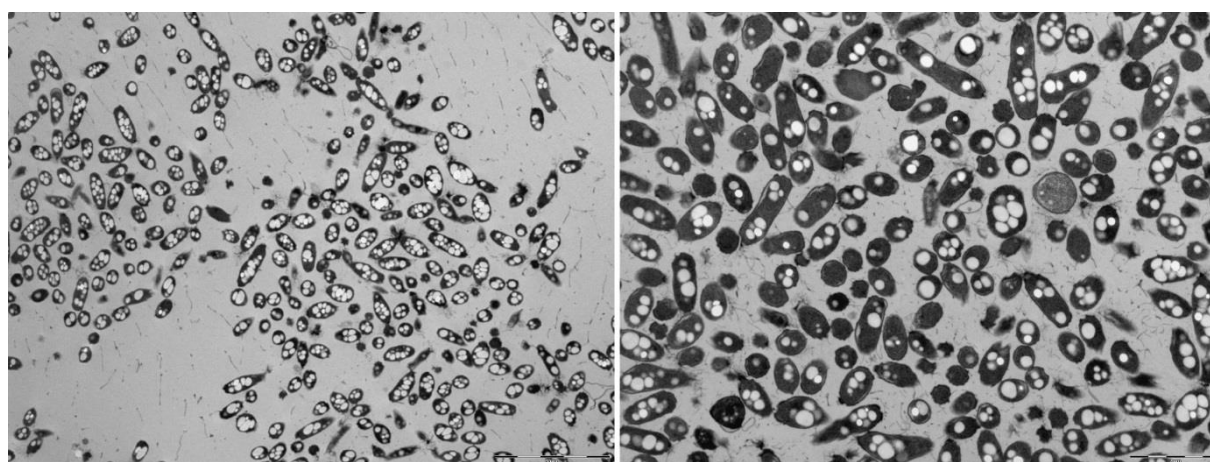
Na obrázku 26 jsou snímky bakteriálních buněk *Tepidiphilus thermophilus*. Zde můžeme pozorovat pouze samotné buňky bez PHB. Připravený vzorek byl pravděpodobně málo koncentrovaný a nalezení samotných buněk ve vzorku bylo obtížné. Produkce PHB se pomocí cryo-skenovací elektronové mikroskopie nepotvrdila. Přesto byl ale vzorek dále analyzován, protože se produkce PHB u tohoto mikroorganismu potvrdila průtokovou cytometrií i fluorescenční mikroskopií.

4.4 Transmisní elektronová mikroskopie

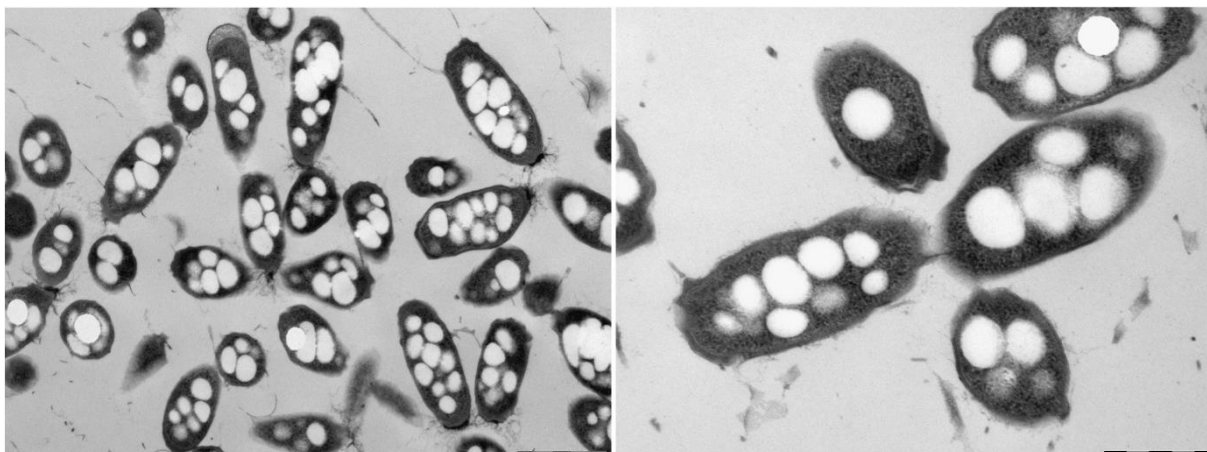


Obrázek 27: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – *Chelatococcus thermostellatus*

Na Obrázku 27 jsou snímky bakteriálních buněk *Chelatococcus thermostellatus*. Průměr granulí se pohybuje kolem 400 nm. Ve většině buněk jsou spíše větší granule, které zabírají většinu objemu cytoplazmy a jsou v ní tedy i rovnoměrně rozmístěny. V některých místech jsou granule blízko u sebe a proto dojde k jejich deformaci. K některým deformacím však mohlo dojít při přípravě tenkých vzorků. Jedná se o gramnegativní bakterie, kde u některých došlo k odchlípení vnější membrány (snímek C). Buněčná integrita byla ale zachována.

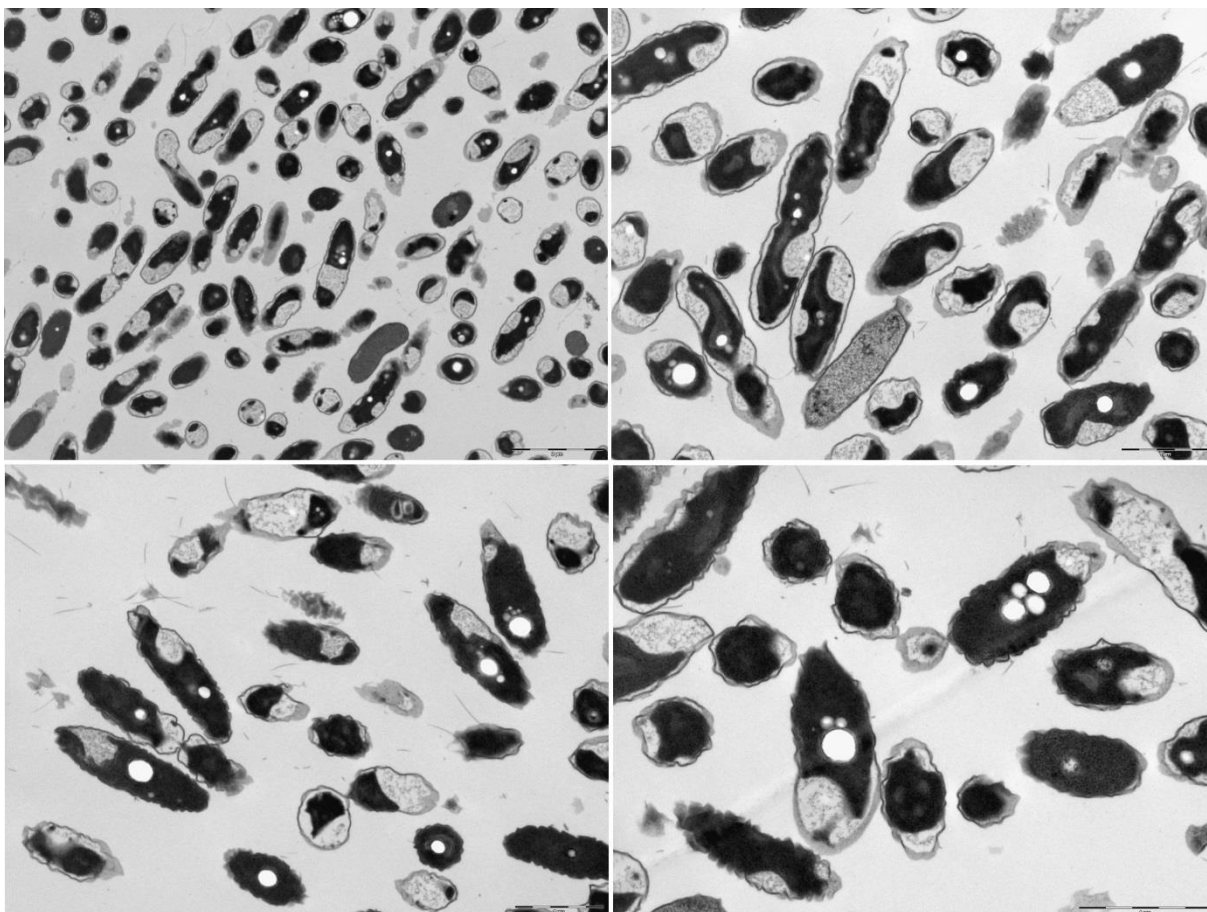


Obrázek 28: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – *Chelatococcus daeguensis*



Obrázek 29: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – *Chelatococcus daeguensis*

Na Obrázku 28 a 29 jsou snímky bakteriálních buněk *Chelatococcus daeguensis*. Průměr granulí PHA u tohoto mikroorganismu se pohybuje kolem 200 nm. Granule jsou tedy menší, ale zaplňují velkou část objemu cytoplazmy. Deformace granulí jsou minimální. Na Obrázku 28 můžeme vidět, že granule nejsou v buňkách rozmístěny rovnoměrně. Protože se však jedná o tenké řezy vzorku, které jsou pro TEM analýzu nezbytné, některé granule, které buňka obsahovala, nemusí být na snímcích zobrazeny. Buněčná integrita byla zachována.



Obrázek 30: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu – *Tepidiphilus thermophilus*

Na Obrázku 30 jsou snímky bakteriálních buněk *Tepidiphilus thermophilus*, které potvrzují jejich produkci PHB. Průměr granulí byl opět kolem 200 nm. Granule jsou tedy menší a bakteriální buňky jich obsahují méně oproti předchozím mikroorganismům. Některé granule

však nemusí být na tenkém řezu vidět. V buňkách viditelně nastal osmotický šok a tak došlo k porušení buněčné integrity, u většiny buněk můžeme pozorovat masivní plazmolýzu. K tomu mohlo dojít u přípravy vzorku.

Díky tomu, že buňky obsahují menší množství granulí, které jsou malé, můžeme dobře pozorovat jejich umístění v buňce. Většina granulí se nachází uprostřed buňky. Pokud buňka obsahuje granulí více, jsou v těsné blízkosti, což by mohlo znamenat, že vznikají na jednom místě v cytoplazmě. Takovéto lokalizaci PHB granulí v buňce odpovídá Micelle Model nebo Scaffold Model (viz kapitola 2.2.1). Jejich umístění je však v tomto případě ovlivněno i deformacemi buněčné stěny, které nastaly vlivem osmotického šoku.

Bakterie rodu *Chelatococcus* jsou nejspíše lepšími producenty PHB. Nejprůkaznější byly snímky z transmisního elektronového mikroskopu, ale dokazují to i snímky z cryo-SEM a fluorescenčního mikroskopu. U mikroorganismu *Tepidiphilus thermophilus* byla produkce PHB výrazně menší čemuž odpovídají i snímky z cryo-SEM a fluorescenčního mikroskopu. Zde je nejspíš potřeba optimalizovat podmínky kultivace, aby byla produkce PHB vyšší.

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zdokumentovat produkci polyhydroxyalkanoátů u vybraných bakteriálních kmenů pomocí průtokové cytometrie a mikroskopických technik. Bakteriální kmeny, které byly v této práci sledovány byly *Pseudomonas thermotolerans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus thermostellatus*.

Nejdříve byli potenciální producenti analyzováni pomocí průtokového cytometru. Pouze u bakteriální kultury *Pseudomonas thermotolerans* se produkce PHB nepotvrdila ani s použitím fluorescenční sondy Nilská červeň ani BODIPY. Z dalších analýz byla tato bakterie vyřazena. Ostatní bakteriální kmeny byly produkce PHB schopny a proto byly analyzovány dále pomocí dalších pokročilých metod.

Následovala analýza pomocí fluorescenčního mikroskopu. Produkce PHB se u všech bakteriálních kmenů potvrdila, avšak u bakterie *Tepidiphilus thermophilus* byla produkce výrazně menší oproti bakteriím rodu *Chelatococcus*. Na snímcích *Tepidiphilus thermophilus* bylo možné pozorovat jednotlivé granule, zatímco u ostatních kmenů byly vidět spíše shluky granulí, které byly blízko u sebe. Všechny pozorované kmeny měly podobný tvar (tyčinkovitý) a podobnou velikost (v rozmezí 2-4 μm).

Jako další proběhla analýza pomocí cryo-skenovacího elektronového mikroskopu. U bakterií rodu *Chelatococcus* byly pozorovány granule PHB i jejich očekávané plastické deformace, které jsou pro ně charakteristické při nízkých teplotách. Produkce PHB u těchto bakterií se tedy potvrdila. Na snímcích bakteriálních buněk *Tepidiphilus thermophilus* bylo možné pozorovat pouze samotné buňky bez granulí PHB.

Poslední metodou využitou pro analýzu buněk v této práci byla transmisní elektronová mikroskopie, která byla, co se týká produkce PHB, ze všech metod nejprůkaznější. Produkce se potvrdila u všech analyzovaných mikroorganismů. Produkce u bakterie *Tepidiphilus thermophilus* byla však výrazně nižší než u bakterií rodu *Chelatococcus*, což bylo i předpokládáno vzhledem k výsledkům z předchozích analýz. Granule PHB byly malé a nacházely se v buňkách také v malém počtu. Díky tomu je však možné pozorovat jejich umístění v bakteriální buňce, které úzce souvisí i s teoriemi vzniku těchto polymerů. Takovéto lokalizaci PHB granulí v buňce by odpovídaly teorie Micelle Model nebo Scaffold Model. Vzhledem k tomu, že jsou buňky dost poškozené vlivem osmotického šoku, by bylo potřeba provést další analýzu, aby bylo možné pozorovat umístění granulí PHB bez nežádoucích vlivů.

6 Seznam použitých zkratk

PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHB	polyhydroxybutyrát
ScI	short – chain – length
Mcl	medium – chain – length
Lcl	long – chain – length
PCR	polymerázová řetězová reakce
FS	dopředný rozptyl
SS	postranní rozptyl
SEM	skenovací elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronový mikroskop
PMT	fotonásobič

7 Seznam použité literatury

- [1] L. FRIDOVICH-KEIL. Bioplastic. In: *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, 29. 4. 2016 [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/bioplastic>
- [2] OBRUČA, Stanislav. Polyhydroxyalkanoáty - přirozeně odbouratelné plasty. In: *Agris* [online]. 9. 8. 2007 [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/155286>
- [3] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [4] BOYANDIN, A., G. KALACHEVA a T. VOLOVA. Production of polyhydroxyalkanoates by luminous bacteria. *New Biotechnology*. 2009, **25**, S59-S60. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.06.285. ISSN 18716784. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678409003859>
- [5] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* [online]. 2014, **16**(8), 2357-2373 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12356>
- [6] RAZA, Zulfqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION*. 2018, 126, 45-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096483051730027>
- [7] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2007, **82**(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [8] Gogolewski S, Javanovic M, Perren SM and Hughes MK, Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/PHV). *Biomaterials* 11: 679–685 (1990).
- [9] Tokiwa Y and Suzuki T, Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* 270: 76–78 (1977).
- [10] PHB synthesis pathway of *R. eutropha* and regulatory circuits. In: *ResearchGate* [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/PHB-synthesis-pathway-of-R-eutropha-and-regulatory-circuits-In-the-three-step-PHB_fig2_256187204
- [11] TAN, Giin-Yu, Chia-Lung CHEN, Ling LI, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 2014, **6**(3), 706-754. DOI: 10.3390/polym6030706. ISSN 2073-4360. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706>
- [12] YOUNG, Kevin D. Bacterial morphology: why have different shapes?. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2007, **10**(6), 596-600 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.009. ISSN 13695274. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527407001348>

- [13] Bakterie. *Agropress* [online]. 07. 06. 2015 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/bakterie/>
- [14] Bacteria. *Biology Dictionary* [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://biologydictionary.net/bacteria/>
- [15] Tvary bakterií. In: *ELUC* [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://eluc.kr-olomoucky.cz/uploads/images/11391/tvar_bakterii.png
- [16] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, **39**(1), 15-27 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.029. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07004433>
- [17] Transmission electron micrograph of *P. putida* CA-3 cells containing PHA granules accumulated from styrene. In: *ResearchGate* [online]. 2005 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Transmission-electron-micrograph-of-P-putida-CA-3-cells-containing-PHA-granules_fig1_7924472
- [18] Introduction to flow cytometry. *Abcam* [online]. Cambridge, USA. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- [19] MACEY, Marion G. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, NJ: Humana Press, c2007. ISBN 15-974-5451-6.
- [20] Overview of the flow cytometer. In: *Abcam* [online]. Abcam [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: https://res.cloudinary.com/abcam/image/fetch/f_auto,q_auto,w_auto,dpr_auto/https://a.static-abcam.com/CmsMedia/Media/flowcytometry01472px.jpg
- [21] Fluorescent light is filtered so that each PMT detects a specific wavelength. In: *Abcam* [online]. Abcam [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: https://res.cloudinary.com/abcam/image/fetch/f_auto,q_auto,w_auto,dpr_auto/https://a.static-abcam.com/CmsMedia/Media/flowcytometry04472px.jpg
- [22] Fluorescenční mikroskopie. In: *Botanická mikrotechnika* [online]. Praha: Aleš Soukup, 2004 [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
- [23] Princip fluorescenčního mikroskopu. In: *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. [cit. 2019-02-15]. Dostupné z: http://www.demo4.smitka.eu/encyklopedie/A/JVAUN_soubory/image002.jpg
- [24] Fluorochromy. *LabGuide* [online]. <https://labguide.cz/> [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://labguide.cz/fluorochromy/>
- [25] Schéma excitace a emise fluorochromu. In: *LAB Guide* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://labguide.cz/wp-content/uploads/2015/01/Excitace-a-emise-fluorochromu-MAL%C3%BD.jpg>
- [26] BAÑUELOS, Jorge. BODIPY Dye, the Most Versatile Fluorophore Ever?. *The Chemical Record* [online]. 2016, **16**(1), 335-348 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1002/tcr.201500238. ISSN 15278999. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201500238>

- [27] BODIPY Lipid Probes. In: *ThermoFisher* [online]. Molecular Probes, 15. 07. 2003 [cit. 2019-03-11]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp03792.pdf&title=Qk9ESVBZIExpGkIFByb2Jlcw==>
- [28] *Schematic of some of the BODIPYs considered for each of the application fields discussed in this work.* [online]. In: . [cit. 2019-02-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/tcr.201500238>
- [29] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK, et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*. 2016, **363**(10), fnw094-. DOI: 10.1093/femsle/fnw094. ISSN 1574-6968. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1093/femsle/fnw094>
- [30] JÄGER, A. a V. GÄRTNEROVÁ. Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura. In: *Fyzikální ústav akademie věd ČR, v. v. i.* [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [31] Při dopadu elektronů na vzorek dochází k vzájemné interakci a vzniká množství různých signálů, které nesou informaci o pozorovaném vzorku. Je-li vzorek dostatečně tenký, část elektronů jím projde. In: *Fyzikální ústav Akademie věd České republiky* [online]. [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [32] SOBUSTA, Jan. Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. *Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého v Olomouci a Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR* [online]. [cit. 2018-11-21]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/~soubusta/OSYS/EI_mikr/EI_mikr.html
- [33] Cryogenic Specimen Preparation Principles. In: *Electron Microscopy Sciences* [online]. Hatfield [cit. 2019-03-07]. Dostupné z: https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/cryosem_adv.aspx
- [34] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK, et al. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing. In: *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6) [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0157778. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157778>